

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



536798

(43) 国際公開日
2004 年 6 月 17 日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/051231 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 1/10, 27/26, 27/62, 30/48, 33/48, 35/08, 37/00, B01D 57/00, 57/02, B81C 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015260

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 28 日 (28.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-349301
2002 年 11 月 29 日 (29.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 Tokyo (JP).

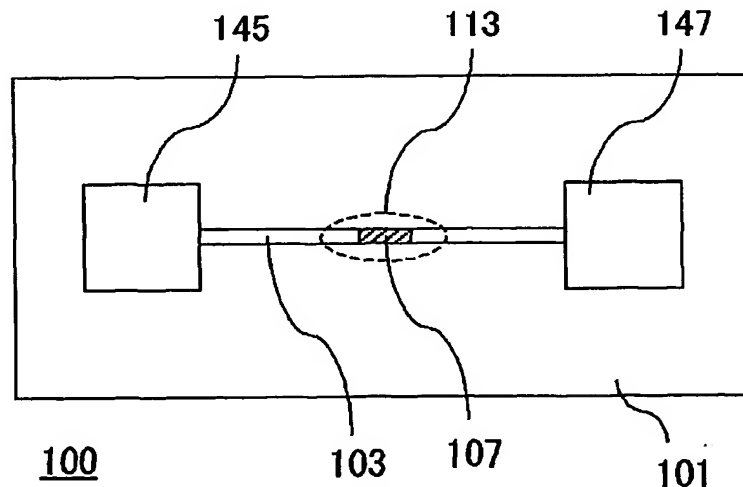
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐野 亨 (SANO, Toru) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 馬場 雅和 (BABA, Masakazu) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 飯田 一浩 (IIIDA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 川浦 久雄 (KAWAURA, Hisao) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 井口 憲幸 (IGUCHI, Noriyuki) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 服部 渉 (HATTORI, Wataru) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 染谷 浩子 (SOMEYA, Hiroko) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 麻生 川 稔 (ASOGAWA, Minoru) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: SEPARATOR AND SEPARATING METHOD

(54) 発明の名称: 分離装置および分離方法



(57) Abstract: A channel (103) is formed in a substrate (101), and a part of the channel (103) is provided with a separation section (107). The separation section (107) has many columnar bodies whose surfaces are provided with an adsorbent layer wherein an adsorbent material which shows a specific interaction with a particular substance is fixed. When a sample is supplied into the channel (103), the particular substance is adsorbed onto the adsorbent layer and separated from the other components. After cleaning the channel (103) using a buffer, a desorption liquid is flowed through the channel (103) to remove the particular substance from the adsorbent layer for collection.

(57) 要約: 基板 (101) に流路 (103) を形成し、流路 (103) の一部に、分離部 (107) を設ける。分離部 (107) には、多数の柱状体が形成され、表面に特定物質に対して特異的相互作用をする被吸着物質が固定化された被吸着物質層が形成されている。試料を流路 (103) に導入すると、特定物質が被吸着物質層に吸着し、他の成分から分離される。流路 (103) 内をバッファで洗浄後、流路 (103) に脱離液を流して特定物質を被吸着物質層から脱着させ、回収する。



(74) 代理人: 速水 進治 (HAYAMI, Shinji); 〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西 2-17-8 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, JP, US.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

分離装置および分離方法

5 技術分野

本発明は、分離装置、分離方法、および質量分析システムに関し、特に物質間の特異的相互作用を利用した分離装置に関する。

背景技術

- 10 アフィニティークロマトグラフィーは、不溶性の担体に分離、精製を目的とする物質に対する特異的相互作用を有する物質を固定化して親和性吸着体を作製し、これをカラムに充填して試料溶液中の目的物質を親和性吸着体に吸着させて分離するクロマトグラフィーである。アフィニティークロマトグラフィーは、物質間の特異的相互作用を利用して成分を分離するため、特に
- 15 生体由来物質の分離、精製に有用な方法である。

しかし、カラムに充填して行うアフィニティークロマトグラフィーは、微量の試料の分離を効率よく行う設計という面では必ずしも適しているとはいえなかった。

- 一方、生体由来物質の分離、分析機能をチップ上に備えたマイクロチップの研究開発が活発に行われている。これらのマイクロチップには、微細加工技術を用いて微細な分離用流路等が設けられており、極めて少量の試料をマイクロチップに導入し、分離を行うことができるようになっている。
- 20

- こうしたマイクロチップを活用する技術において、アフィニティークロマトグラフィーの技術を導入する試みが提案されている（特許文献1）。この
- 25 装置においては、流路中にビーズ等を担体とする親和性吸着体の充填領域が設けられており、流路に目的成分を含む試料を流すと、目的成分が親和性吸着体に吸着されるようになっている。ところが、このような構成では、従来のカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー同様、親和性吸着体の

充填率が高い場合、親和性吸着体同士が十分に離間して存在することができず、親和性吸着体の表面全体が目的物質との吸着に関与することができず、分離効率が低下するという課題があった。

- 5 また、特許文献 1 に記載の装置では、チャンネルの壁を不溶性の担体とすることができる旨記載されているが、壁のみを用いる場合表面積が小さく、十分な親和性吸着体を備えようとする、チャンネルの長さが大きくなってしまっていた。

- 10 さらに、目的の物質を親和性吸着体に吸着させた後、親和性吸着体から脱着させて回収する必要があるが、この際に高濃度の塩溶液や有機溶媒を含む溶液を用いるため、目的の物質がタンパク質等の高次構造を有する物質である場合、立体構造の不可逆的な変性や、失活などが生じるという課題があった。

特許文献 1 特表 2 0 0 2 - 5 0 2 5 9 7 号公報

15 発明の開示

- 上記事情に鑑み、本発明の目的は、特異的相互作用を用いて試料中の特定物質を効率よく分離する装置または方法を提供することにある。また、本発明の別の目的は、微量の特定物質を効率よく分離し、回収する小型の分離装置を提供することにある。また、本発明のさらに別の目的は、特定物質を吸着させた後簡易な方法で脱着させ、高い活性を維持した状態で回収する分離装置または分離方法を提供することにある。また、本発明のさらにまた別の目的は、生体試料に適用可能な質量分析システムを提供することにある。

- 25 本発明によれば、基材と、該基材に設けられた試料が流れる流路と、該流路に設けられ、前記試料中の特定物質を分離する分離部と、該分離部に設けられ、前記流路よりも幅狭の微細流路と、を含み、前記分離部に前記特定物質と選択的に吸着または結合する被吸着物質の層が形成されていることを特徴とする分離装置が提供される。

本発明において、「選択的に吸着または結合する」とは、被検物質のみが

検出物質と吸着または結合し、試料中に含まれる他の物質は吸着または結合しないことをいう。吸着または結合の様式に制限はなく、物理的な相互作用であっても、化学的な相互作用であってもよい。また、選択的な吸着または結合のことを、以下適宜「特異的相互作用」と呼ぶ。

- 5 本発明に係る分離装置は、分離部においてアフィニティークロマトグラフィーの原理を利用して試料中の特定物質の分離を行う装置である。本発明に係る分離装置では、基材に形成された流路に分離部が設けられた構成となっているため、特定物質を含む試料を流路に導入すると、分離部に形成された被吸着物質の層に選択的に吸着または結合させることができる。このため、
10 簡便な操作により特定物質の分離を行うことができる。

また、分離部に流路よりも幅狭の微細流路を形成することにより、分離部表面の被吸着物質に接近し、相互作用することができる特定物質の分子数を増加させることができる。よって、特定物質を効率よく分離することが可能である。

- 15 本発明に係る分離装置はマイクロチップ上でアフィニティークロマトグラフィーを行うことができるため、 μ TAS (Micrototal Analytical System: マイクロトータル・アナリティカル・システム) に組み込むことも可能となる。たとえば、分離部により分離された試料を試料乾燥部に連通する構成とすることにより、分離した試料を乾燥させて回収し、また質量分析等に供することが可能となる。
20

本発明によれば、基材と、該基材に設けられた試料が流れる流路と、該流路に設けられ、前記試料中の特定物質を分離する分離部と、該分離部に設けられた突起部と、を含み、前記分離部に前記特定物質と選択的に吸着または結合する被吸着物質の層が形成されていることを特徴とする分離装置が提供
25 される。

本発明に係る分離装置では、分離部に突起部が形成されているため、分離部表面の被吸着物質に接近し、相互作用することができる特定物質の分子数を増加させることができる。また、突起部の形状および配置を調節すること

により、分離部における試料通過経路の幅を調節することができる。したがって、分離部の形状を特定物質の分子サイズに応じて最適化することができるため、担体粒子を流路に充填する従来の方法に比べて分離効率を向上させることができる。

- 5 本発明の分離装置において、前記分離部および前記流路に電極が設けられ、前記電極間に電圧を付与する電圧付与手段をさらに備える構成とすることができる。

- また、本発明の分離装置において、前記分離部に突起部が設けられ、該突起部に電極が形成されている構成とすることができる。こうすることにより、
10 帯電した特定物質をより一層効率よく分離部に誘導することが可能となる。
また、分離部において被吸着物質に選択的に吸着または結合した特定物質を脱着させる際にも、電極に付与する電位の正負を制御すれば脱着が容易となるため、流路に流す脱離用溶液の塩濃度、有機溶媒濃度等を低減することができる。したがって、特定物質がタンパク質等である場合にも、失活や変性
15 を抑制することができる。

- 本発明の分離装置において、前記特定物質と前記被吸着物質との組み合わせは、抗原と抗体、酵素と基質、酵素と基質誘導体、酵素と阻害剤、糖とレクチン、DNAとDNA、DNAとRNA、タンパク質と核酸、金属とタンパク質またはリガンドとレセプターのいずれかの組み合わせとすることができる。こうすることにより、生体試料中から特定物質を分離することができる。このとき、本発明に係る分離装置は、基材に流路が形成された構成であり、微量の試料の分離にも適した構成であるため、確実に分離を行うことができる。
- 20

- 本発明の分離装置において、前記被吸着物質がスペーサーを介して前記基
25 材の表面に備えられた構成とすることができる。スペーサーを設けることにより、被吸着物質と基板との間に好適な空間が形成されるため、特定物質の吸着または結合を効率よく形成させることができる。また、スペーサーを親水性分子とすることにより、分離部の表面が親水性のグラフト鎖で被覆され

ることになるため、分離部表面への特定物質以外の不要成分の非特異的な吸着を抑制することができる。

本発明によれば、基材に設けられた流路と、該流路に設けられた分離部と、該分離部に設けられ、前記流路よりも幅狭の微細流路と、を含む分離装置の
5 分離部に、分離対象物質に選択的に吸着または結合する被吸着物質と異なる符号の電圧を印加しながら、前記流路に前記被吸着物質を含む液体を導入し、前記分離部に吸着させるステップと、前記流路に前記分離対象物質を含む試料を導入し、前記被吸着物質に選択的に吸着または結合させるステップと、前記流路に前記分離対象物質を前記被吸着物質から脱離させる脱離液を導入
10 し、前記分離対象物質を脱離させ、回収するステップと、を行うことを特徴とする分離方法が提供される。

また、本発明によれば、基材に設けられた流路と、該流路に設けられた分離部と、該分離部に設けられた突起部と、を含む分離装置の分離部に、分離対象物質に選択的に吸着または結合する被吸着物質と異なる符号の電圧を印
15 加しながら、前記流路に前記被吸着物質を含む液体を導入し、前記分離部に吸着させるステップと、前記流路に前記分離対象物質を含む試料を導入し、前記被吸着物質に選択的に吸着または結合させるステップと、前記流路に前記分離対象物質を前記被吸着物質から脱離させる脱離液を導入し、前記分離対象物質を脱離させ、回収するステップと、を行うことを特徴とする分離方
20 法が提供される。

本発明に係る分離方法によれば、分離部に電圧を印加しながら被吸着物質の吸着、試料の導入、および試料中の特定物質の脱離と回収を行うことにより、被吸着物質をカップリング剤等を用いて基材に固定化することなく、簡便かつ確実に特定物質の分離を行うことが可能となる。たとえば、被吸着物質がマイナスに帯電している場合、分離部にプラスの電位を付与することにより、被吸着物質を分離部に吸着させることができる。

本発明によれば、生体試料を分子サイズまたは性状に応じて分離する分離手段と、前記分離手段により分離された試料に対し、酵素消化処理を含む前

処理を行う前処理手段と、前処理された試料を乾燥させる乾燥手段と、乾燥後の試料を質量分析する質量分析手段と、を備え、前記分離手段は、前記分離装置を含むことを特徴とする質量分析システムが提供される。ここで生体試料は、生体から抽出したものであってもよく、合成したものであってもよい。

なお、以上の構成要素の任意の組み合わせや、本発明の構成要素や表現を方法、装置の間で相互に置換したものもまた、本発明の態様として有効である。

以上説明したように本発明によれば、基材に設けられた流路と、流路に設けられた分離部と、分離部に設けられ、流路よりも幅狭の微細流路と、を含み、分離部に試料中の特定物質と選択的に吸着または結合する被吸着物質の層が形成されていることにより、特異的相互作用を用いて試料中の特定物質を効率よく分離する装置または方法が実現される。また、本発明によれば、微量の特定物質を効率よく分離し、回収する小型の分離装置が実現される。また、本発明によれば、特定物質を吸着させた後簡易な方法で脱着させ、高い活性を維持した状態で回収する分離装置または分離方法が実現される。また、本発明によれば、生体試料に適用可能な質量分析システムが実現される。

図面の簡単な説明

上述した目的、およびその他の目的、特徴および利点は、以下に述べる好適な実施の形態、およびそれに付随する以下の図面によってさらに明らかになる。

図 1 は、本実施形態に係る分離装置の構成を示す上面図である。

図 2 は、図 1 の分離装置の分離領域の構成を示す図である。

図 3 は、図 1 の分離装置の分離部の構成を示す斜視図である。

図 4 は、図 1 の分離装置の表面の構成を説明するための図である。

図 5 は、図 1 の分離装置の柱状体表面の構成を説明するための図である。

図 6 は、本実施形態に係る分離装置の構成を示す図である。

図 7 は、図 6 の分離装置の液溜めの構成を説明するための図である。

図 8 は、図 7 の液溜めの B - B' 方向の構成を説明するための図である。

図 9 は、本実施形態に係る分離装置の分離部の構成を示す図である。

図 10 は、図 1 の分離装置の分離部の構成を示す図である。

5 図 11 は、質量分析装置の構成を示す概略図である。

図 12 は、本実施形態に係る分離装置の構成を示す図である。

図 13 は、図 12 の分離装置の乾燥部の構成を示す図である。

図 14 は、本実施形態に係る分離装置の作製方法を示す工程断面図である。

図 15 は、本実施形態に係る分離装置の作製方法を示す工程断面図である。

10 図 16 は、本実施形態に係る分離装置の作製方法を示す工程断面図である。

図 17 は、本実施形態に係る分離装置の作製方法を示す工程断面図である。

図 18 は、分離装置の他の例を示す図である。

図 19 は、分離装置の他の例を示す図である。

図 20 は、図 18 に示した分離装置のサンプル定量管の近傍の拡大図であ

15 る。

図 21 は、図 19 に示した分離装置の詳細図である。

図 22 は、本実施形態の分離装置を含む質量分析システムのブロック図である。

20 発明を実施するための最良の形態

以下、好ましい実施の形態について図面を参照しながら説明する。なお、すべての図面において、同様な構成要素には同様の符号を付し、適宜説明を省略する。

(第一の実施形態)

25 図 1 は、本実施形態に係る分離装置 100 の上面図である。分離装置 100 においては、基板 101 上に流路 103 が設けられ、流路 103 の一部に分離部 107 を含む分離領域 113 が形成されている。また、流路 103 の両端はそれぞれ試料導入部 145 および液溜め 147 に連通している。

なお、流路 1 0 3 の上面を被覆部材により被覆してもよい。流路 1 0 3 の上面に被覆部材を設けることにより、試料液体の乾燥が抑制される。また、試料中の成分がタンパク質等高次構造を有する物質である場合、表面が親水性の被覆部材を用い、流路 1 0 3 内を密閉することにより、気液界面においてこの成分が不可逆的に変性することが抑制される。

図 2 は、分離装置 1 0 0 における分離領域 1 1 3 の拡大図である。図 2 (a) は上面図、図 2 (b) は図 2 (a) の A-A' 方向の断面図である。分離部 1 0 7 においては、流路 1 0 3 中に柱状体 1 0 5 が等間隔で規則正しく形成されており、柱状体 1 0 5 間の間隙を液体が流れる。柱状体 1 0 5 の表面には、図 4 において後述するように被吸着物質層が形成されているため、試料液体中の特定成分が柱状体 1 0 5 表面において非吸着物質と選択的に吸着または結合することが可能である。

図 3 は、分離部 1 0 7 における基板 1 0 1 の構成を示す斜視図である。図 3 において、W は流路 1 0 3 の幅、D は流路 1 0 3 の深さを示し、 ϕ は柱状体 1 0 5 の直径、d は柱状体 1 0 5 の高さ、p は隣接する柱状体 1 0 5 間の平均間隔を示す。これらの各寸法は、たとえば図 3 に示された範囲とすることができる。また、分離目的の分子の直径を R とした場合、R と p、D、または d については次の条件を満たすことが好ましい。こうすることにより、分離部 1 0 7 に導入された試料中の特定物質 A' が効率よく壁面に接触し、分離される。

$$p : 0.5 R \leq p \leq 5.0 R$$

$$D : 5 R \leq D \leq 5.0 R$$

$$d : R \leq d \leq 5.0 R$$

図 4 は、基板 1 0 1 の表面の構成を説明するための図である。基板 1 0 1 には、被吸着物質層 1 0 9 が形成されている。すなわち、被吸着物質は基板 1 0 1 の表面に固定化されている。

また図 5 は、柱状体 1 0 5 表面を例に、被吸着物質層 1 0 9 に被吸着物質 A が固定化されている様子を説明する図である。図 5 (a) では、柱状体 1

05の表面に低分子物質が被吸着物質Aとして固定化されている。このような柱状体105に特定物質A'を含む試料液体が導入されると、図5(b)に示すように、試料液体中の特定物質A'が被吸着物質Aに選択的に吸着または結合し、複合体を形成する。したがって、分離装置100では、被吸着物質Aに対する特異的相互作用を有する特定物質A'のみを選択的に被吸着物質層109に吸着させ、試料中の他の成分から分離することができる。

分離装置100において、基板101の材料としてシリコンを用いる。また、シリコンにかえて、たとえば石英等のガラス、プラスチック材料等を用いてもよい。プラスチック材料として、たとえばシリコン樹脂、PMMA(ポリメタクリル酸メチル)、PET(ポリエチレンテレフタレート)、PC(ポリカーボネート)等の熱可塑性樹脂や、エポキシ樹脂などの熱硬化性樹脂等が挙げられる。このような材料は成形加工が容易なため、乾燥装置の製造コストを抑えることができる。

柱状体105は、たとえば、基板101を所定のパターン形状にエッチングすることにより形成することができるが、その作製方法には特に制限はない。また、図2の柱状体105は円柱であるが、円柱、擬円柱等の擬円柱に限らず、円錐、楕円錐等の錐体；三角柱、四角柱等の多角柱；その他の断面形状を有する柱体；等としてもよい。

被吸着物質層109に備える被吸着物質Aと特定物質A'は、選択的に吸着または結合する組み合わせから選択される。このような組み合わせとして、たとえば、

- (a) リガンドとレセプター、
- (b) 抗原と抗体、
- (c) 酵素と基質、酵素と基質誘導体、または酵素と阻害剤、
- (d) 糖とレクチン、
- (e) DNA(デオキシリボ核酸)とRNA(リボ核酸)、またはDNAとDNA、
- (f) タンパク質と核酸

(g) 金属とタンパク質

の組み合わせを用いることができる。それぞれの組み合わせにおいて、任意の一方が特定物質となり、他方が被吸着物質となる。

5 (a) の場合、ステロイドなどのホルモン、神経伝達物質などの生理活性物質、薬物、その他の血中因子、インシュリンレセプターなどの細胞膜レセプター、あるいは上記レセプターに対して親和性を有するタンパク質、糖タンパク質、糖脂質、または低分子物質など、を用いることができる。

10 (b) の場合、抗原は、いわゆるハプテンなどの低分子物質であっても、タンパク質などの高分子物質であってもよい。抗原の例として、たとえば、H C V 抗原や、C E A、P S A などの腫瘍マーカー、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、異常プリオン、アルツハイマー症に特有のタンパク質等を用いることができる。

15 (c) の場合、たとえばインフルエンザウイルスであるノイラミニダーゼとその阻害剤候補、H I V ウイルスの逆転写酵素とその阻害剤候補、または H I V プロテアーゼとその阻害剤候補等の組み合わせとすることができる。

(d) の場合、たとえば N-アセチル-D-グルコサミンと小麦胚レクチン、コンカナバリン A (C o n A) と C o n A レセプター糖タンパク質等の組み合わせを用いることができる。

20 (e) の場合、変異した DNA と、変異した DNA に対する相補的 DNA などを用いることができる。

(f) の場合、たとえば DNA 結合タンパク質と DNA などの組み合わせを用いることができる。

また、(g) の場合、たとえばニッケルとヒスチジンタグ (H i s - T a g) などの組み合わせを用いることができる。

25 なお、流路 1 0 3 の上部に被覆部材を設ける場合、その材料としては、たとえば基板 1 0 1 と同様の材料の中から選択することができる。基板 1 0 1 と同種の材料を用いてもよいし、異なる材料としてもよい。

次に、分離装置 1 0 0 を用いた特定物質 A' の分離方法について説明する。

図 1 にもどり、特定物質 A' を含む試料液体を試料導入部 1 4 5 に注入し、毛細管効果あるいはポンプを用いた圧入などにより流路 1 0 3 に展開させる。試料液体の流速は、たとえば 10 nl/min 以上 $100 \mu\text{l/min}$ 以下とする。すると、図 5 を用いて前述したように、分離部 1 0 7 において被吸着物質 A に対する特異的相互作用を有する特定物質 A' のみが選択的に被吸着物質層 1 0 9 に吸着する。吸着しなかった成分は、溶媒または分散媒である液体とともに液溜め 1 4 7 に導かれる。

次に、試料導入部 1 4 5 から流路 1 0 3 洗浄用の緩衝液等を流し、流路 1 0 3 に滞留する特定物質 A' 以外の成分を除去する。このとき、特定物質 A' と被吸着物質 A とは特異的相互作用により吸着または結合しているため、これらが解離することはない。

流路 1 0 3 を洗浄した後、特定物質 A' を被吸着物質 A から脱着させる。脱着方法として、たとえば 0.1 mol/l 以上 1 mol/l 以下の NaCl 溶液を試料導入部 1 4 5 から流路 1 0 3 に導入する方法を用いることができる。また、被吸着物質 A と特定物質 A' とが抗原と抗体であるような場合には、被吸着物質 A に対する特異的相互作用を有し、被吸着物質 A に対する結合定数が特定物質 A' よりも大きい物質を競争阻害剤として流路 1 0 3 に導入し、特定物質 A' を脱着させることもできる。脱着した特定物質 A' は、液溜め 1 4 7 に導かれ、回収される。

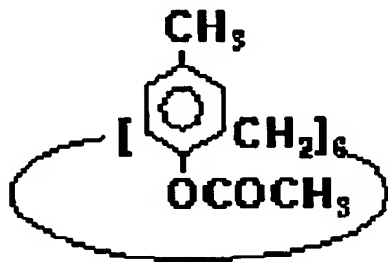
以上のように、分離装置 1 0 0 は流路 1 0 3 に分離部 1 0 7 が形成されているため、試料が微量である場合にも流路 1 0 3 に導入することにより特定物質 A' を分離し、回収することが可能である。カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーに比べ、操作は簡便である。また、分離装置 1 0 0 は使い捨てのチップであるため、分離装置 1 0 0 の洗浄操作が不要であり、確実に分離を行うことができる。

次に、分離装置 1 0 0 の製造方法について説明する。

基板 1 0 1 上への流路溝 1 0 3 および柱状体 1 0 5 の形成は、基板 1 0 1 を所定のパターン形状にエッチング等を行うことができるが、その作製方法

には特に制限はない。

図 1 5、図 1 6、および図 1 7 はその一例を示す工程断面図である。各分
図において、中央が上面図であり、左右の図が断面図となっている。この方
法では、微細加工用レジストのカリックスアレーンを用いた電子線リソグラ
5 フィ技術を利用して柱状体 1 0 5 を形成する。カリックスアレーンの分子構
造の一例を以下に示す。カリックスアレーンは電子線露光用のレジストとし
て用いられ、ナノ加工用のレジストとして好適に利用することができる。



- ここでは、基板 1 0 1 として面方位が (1 0 0) のシリコン基板を用いる。
- 10 まず、図 1 5 (a) に示すように、基板 1 0 1 上にシリコン酸化膜 1 8 5、
カリックスアレーン電子ビームネガレジスト 1 8 3 をこの順で形成する。シ
リコン酸化膜 1 8 5、カリックスアレーン電子ビームネガレジスト 1 8 3 の
膜厚は、それぞれ 4 0 nm、5 5 nm とする。次に、電子ビーム (E B) を
用い、柱状体 1 0 5 となる領域を露光する。現像はキシレンを用いて行い、
15 イソプロピルアルコールによりリンスする。この工程により、図 1 5 (b)
に示すように、カリックスアレーン電子ビームネガレジスト 1 8 3 がパター
ニングされる。

- つづいて全面にポジフォトレジスト 1 5 5 を塗布する (図 1 5 (c))。
膜厚は 1. 8 μ m とする。その後、流路 1 0 3 となる領域が露光するように
20 マスク露光をし、現像を行う (図 1 6 (a))。

次に、シリコン酸化膜 1 8 5 を CF_4 、 CHF_3 の混合ガスを用いて R I
E エッチングする。エッチング後の膜厚を 3 5 nm とする (図 1 6 (b))。
レジストをアセトン、アルコール、水の混合液を用いた有機洗浄により除去

した後、酸化プラズマ処理をする（図 16（c））。つづいて、基板 101 を HBr ガスを用いて ECR エッチングする。エッチング後のシリコン基板の膜厚を 400 nm とする（図 17（a））。つづいて BHF バッファードフッ酸でウェットエッチングを行い、シリコン酸化膜を除去する（図 17 5 （b））。以上により、基板 101 上に流路 103 および柱状体 105 が形成される。

ここで、図 17（b）の工程に次いで、基板 101 表面の親水化を行うことが好ましい。基板 101 表面を親水化することにより、流路 103 や柱状体 105 に試料液体が円滑に導入される。特に、柱状体 105 により流路が 10 微細化した分離部 107 においては、流路の表面を親水化することにより、試料液体の毛管現象による導入が促進され、分離効率が向上するため好ましい。

そこで、図 17（b）の工程の後、基板 101 を炉に入れてシリコン熱酸化膜 187 を形成する（図 17（c））。このとき、酸化膜の膜厚が 30 nm 15 となるように熱処理条件を選択する。シリコン熱酸化膜 187 を形成することにより、分離装置内に液体を導入する際の困難を解消することができる。その後、被覆 189 で静電接合を行い、シーリングして分離装置を完成する（図 17（d））。

なお、基板 101 にプラスチック材料を用いる場合、エッチングやエンボス成形等の金型を用いたプレス成形、射出成形、光硬化による形成等、基板 20 101 の材料の種類に適した公知の方法で行うことができる。

基板 101 にプラスチック材料を用いる場合にも、基板 101 表面の親水化を行うことが好ましい。基板 101 表面を親水化することにより、流路 103 や柱状体 105 に試料液体が円滑に導入される。特に、柱状体 105 により流路 103 が微細化した分離部 107 においては、流路 103 の表面を 25 親水化することにより、試料液体の毛管現象による導入が促進され、乾燥効率が向上するため好ましい。

親水性を付与するための表面処理としては、たとえば、親水基をもつカッ

プリング剤を流路 103 の側壁に塗布することができる。親水基をもつカップリング剤としては、たとえばアミノ基を有するシランカップリング剤が挙げられ、具体的には $N-\beta$ (アミノエチル) γ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、 $N-\beta$ (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 $N-\beta$ (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 N -フェニル- γ -アミノプロピルトリメトキシシラン等が例示される。これらのカップリング剤は、スピンコート法、スプレー法、ディップ法、気相法等により塗布することができる。

- 10 また、流路壁に試料の分子が粘着するのを防ぐために、流路 103 に付着防止処理を行うことができる。付着防止処理としては、たとえば、細胞壁を構成するリン脂質に類似した構造を有する物質を流路 103 の側壁に塗布することができる。このような処理により、試料がタンパク質等の生体成分である場合、成分の変性を防ぐことができると共に、流路 103 における特定
- 15 の成分の非特異吸着を抑制することができ、回収率を向上することができる。親水性処理および付着防止処理としては、たとえば、リピジュア（登録商標、日本油脂社製）を用いることができる。この場合、リピジュア（登録商標）を 0.5 wt % となるように TBE バッファー等の緩衝液に溶解させ、この溶液で流路 103 内を満たし、数分間放置することによって流路 103 の内
- 20 壁を処理することができる。この後、溶液をエアガン等で吹き飛ばして流路 103 を乾燥させる。付着防止処理の他の例としては、たとえばフッ素樹脂を流路 103 の側壁に塗布することができる。

次に、分離部 107 における基板 101 表面への被吸着物質の固定化方法として、たとえば、物理的吸着法、共有結合法、などの方法を用いることができる。

25 できる。

物理的吸着法を用いる場合、たとえば被吸着物質の単分子膜を作製し、分離部 107 における基板 101 の表面に吸着させることができる。

また、共有結合法を用いる場合、基板 101 表面に表面改質を施し反応性

の官能基や活性基を導入し、被吸着物質を含む溶液と基板 101 とを接触させ、基板 101 表面に被吸着物質を結合させることができる。基板 101 の表面改質方法は、目的に応じ適宜選択することができるが、たとえば、プラズマ処理や、イオンビームによる処理、電子線処理、などを用いることができる。このとき、基板 101 の表面にスペーサー分子を固定化し、スペーサー分子と被吸着物質とを結合させることもできる。スペーサー分子の固定化方法については後述する。

また、石英系ガラス製などの基板 101 を用いる場合、この表面に被吸着物質 A を化学的に結合させるために、シランカップリング剤などのカップリング剤を用いることができる。カップリング剤を用いる場合、柱状体 105 の表面にカップリング剤を塗布した後、カップリング剤のもつ有機官能基と被吸着物質 A とを結合させる。このとき、たとえば被吸着物質 A のチオール基や、アミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基、水酸基等を利用することができる。たとえば、リガンドのカルボキシル基を用いる場合、リガンドの基板 101 の固定化は以下のようにして行うことができる。基板 101 を、 $-NH_2$ 基を有するシランカップリング剤の水溶液に浸漬する。シランカップリング剤の濃度は、たとえば 0.1% 以上 2.0% 以下とする。シランカップリング剤により表面処理された基板 101 に、たとえばカルボジイミド法など、縮合試薬を用いた方法によりリガンドを固定化する。なお、固定化の際には必要に応じて、N-ヒドロキシスクシンイミドなどの活性化剤を併用してもよい。シランカップリング剤の $-NH_2$ 基と、リガンドのカルボキシル基とが結合する。こうして、リガンドが固定化された層を被吸着物質層 109 とする分離部 107 が得られる。

また、別の固定化方法として、被吸着物質 A を予めビオチン化する方法がある。ビオチン化しておけば、基板 101 にアビジンまたはストレプトアビジンを固定化し、ビオチンとアビジンとの相互作用により特定物質を選択的に吸着させることができる。このとき、アビジンとビオチンとの間の結合定数は通常の抗原抗体間の結合定数等に比べて顕著に大きいため、ビオチン化

した被吸着物質Aが基板101に固定化されたアビジン等から脱離しない条件で被吸着物質Aから特定物質A'を脱離させ、回収することができる。

基板101への被吸着物質の固定密度は、特定物質が被吸着物質と結合できる程度に十分に密であることが好ましい。こうすることにより、試料中に含まれる他の物質が、基板101表面に非特異的に吸着または結合することを抑制することができる。また特に、たとえば被吸着物質Aが低分子物質で特定物質A'がかさ高い構造の高分子物質である場合、立体障害により特定物質A'が被吸着物質Aに吸着または結合することができなくなることがないような固定密度とすることが好ましい。

- さらに、被吸着物質層109の形成方法として、被吸着物質を固定化する方法にかわり、分子インプリンティング法を用いて、特定物質が結合できる鑄型ポリマー層を基板101表面に設けることもできる。分子インプリンティング法では、目的分子にあわせてテーラーメイド的にそれを認識する高分子材料を一段階で合成する方法で、具体的には以下のようにして行う。まず、目的分子を鑄型として、機能性モノマーを共有結合または非共有結合により結合させ、鑄型分子-機能性ポリマー複合体を形成させる。ここで、機能性モノマーとして鑄型分子と結合可能な官能基と、ビニル基などの重合可能な基を有する2官能性以上のモノマーを用いることができる。次に、鑄型分子-機能性モノマー複合体を含む溶液に、架橋剤と重合開始剤を加え、分離部107の壁面にて重合反応を行う。そして、鑄型分子を、たとえば酵素分解などにより、重合したポリマーから分解除去する。すると、得られたポリマーには、鑄型分子との特異的結合部位が形成される。

- なお、前述のように、被吸着物質Aを化学的に結合させる場合、図10に示すように、基板101と被吸着物質Aとの間に、適宜、スペーサー119を設けることもできる。スペーサー119とは、特定物質A'と被吸着物質Aとの選択的な吸着または結合が立体障害なしに進行するように、被吸着物質Aを基板101から離すため、基板101と被吸着物質Aとの間に挿入させる化合物のことをいう。こうすることにより、図10(a)および図10

(b)のように、被吸着物質Aと特定物質A'との吸着または結合が容易となる。また、スペーサー119に親水性の分子を用いることにより、基板101表面への目的外成分の非選択的な吸着を抑制することができる。スペーサー119の鎖長は比較的短いことが好ましい。また、活性基を有するものが好ましい。被吸着物質Aの固定化操作がより簡便になるからである。活性基は、被吸着物質Aとの反応性を有する官能基であれば特に制限はない。なお、スペーサー119に活性基がない場合は、縮合試薬等を用いてスペーサー119の官能基と被吸着物質Aとを結合させる。たとえば、被吸着物質Aのチオール基や、アミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基、水酸基等を利用することができる。

スペーサー119は、アフィニティークロマトグラフィーやSPR法などで用いられる分子を適宜選択することができるが、たとえば、ヘキサメチレンジアミン(HMDA)、エチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDG)や、鎖長の短いポリエチレングリコール(PEG)、ポリエチレンオキサイド(PEO)、デキストランまたはその誘導体、などを用いることができる。

さらに、基板101表面に被吸着物質Aが固定化された構成にかわり、分子インプリンティング法により、特定物質A'が結合できる鑄型ポリマー層が設けられた構成とすることもできる。

20 (第二の実施形態)

本実施形態は、第一の実施形態に記載の分離装置において、分離部107が隔壁によって隔てられた複数の細分化流路となっている構成である。図9は、本実施形態に係る分離装置100の分離領域113の構成を示す図である。図9(a)は上面図、図9(b)は図9(a)のC-C'方向の断面図である。分離部153においては、流路103中に隔壁151が等間隔で規則正しく形成されており、隔壁151間の間隙を液体が流れる。すなわち、流路103より幅狭の流路が形成されており、これらの微細流路が分離用流路149となる。そして、分離用流路149の表面には、第一の実施形態と

同様に、被吸着物質層 109 が形成されているため、試料液体中の特定物質 A' が分離用流路 149 において非吸着物質 A と選択的に吸着または結合することが可能である。

図 9 の分離領域 113 は、第一の実施形態と同様にして作製することができる。

(第三の実施形態)

本実施形態は、第一の実施形態に記載の分離装置 100 において、分離部 107 に設けられた柱状体 105 の内部に電極が設けられており、これらの電極に電位を付与する態様である。分離部 107 の内部に電極を形成する方法としての一例は以下の通りである。図 14 は、本実施形態に係る分離装置の製造方法を示す工程断面図である。まず、電極の装着部分を含む金型 173 を用意する（図 14 (a)）。そして、金型 173 に電極 175 を設置する（図 14 (b)）。電極 175 に用いる材料は、たとえば Au、Pt、Ag、Al、Cu などとする。次に、金型 173 上に被覆用金型 179 をセットして電極 175 を固定し、基板 101 となる樹脂 177 を金型 173 内に射出し、成形する（図 14 (c)）。樹脂 177 として、たとえば PMMA を用いる。

そして、成形された樹脂 177 を金型 173 および被覆用金型 179 から外すと、流路 103 の形成された基板 101 が得られる（図 14 (d)）。基板 101 の裏面の電極 175 表面の不純物をアッシングにより除去し、電極 175 材料金属を露出させる。必要に応じて、基板 101 の底面に金属膜を蒸着等により形成し、これを配線 181 とする（図 14 (e)）。以上のようにして、流路 103 中に電極 175 を柱状体 105 とする分離部 107 が形成される。こうして形成された電極または配線 181 は、外部電源（不図示）に接続され、電圧を印加することができるようになっている。なお、上記工程の後、流路 103 の全面に絶縁膜を形成してもよい。このとき、絶縁膜の厚さは、たとえば 10 nm 以上 500 nm 以下とする。

なお、分離装置 100（図 1）において、試料導入部 145 および液溜め

1 4 7についても同様の方法あるいは第四の実施形態に記載の方法で電極を形成しておけば、電極を基板 1 0 1 の下面等を導通させて外部電源（不図示）に接続し、試料導入部 1 4 5 と分離部 1 0 7 との間、分離部 1 0 7 と液溜め 1 4 7 との間、および試料導入部 1 4 5 と液溜め 1 4 7 との間、にそれぞれ電圧を付与することが可能となる。

このような構成とすると、試料中の目的成分の分離をより一層確実に効率よく行うことができる。たとえば、特定物質 A' がタンパク質であって、そのタンパク質の等電点よりも低 pH の緩衝液に溶解された試料から分離を行う場合、試料導入部 1 4 5 を正極、分離部 1 0 7 を負極として通電すると、
10 正に帯電したタンパク質が効率よく分離部 1 0 7 に導かれ、被吸着物質層 1 0 9 に選択的に吸着する。流路 1 0 3 中の他の成分を除去した後、今度は分離部 1 0 7 を正極、液溜め 1 4 7 を負極として通電すれば、被吸着物質層 1 0 9 に保持されていたタンパク質の脱離および液溜め 1 4 7 への誘導が促進される。なお、被吸着物質層 1 0 9 に保持されていたタンパク質を脱離させる際には、交流電場を付与することにより、タンパク質分子の運動性が増し、
15 さらに脱離が促進される。

このため、特定物質 A' と被吸着物質 A とを脱離させるために流路 1 0 3 に流す溶離液の塩濃度や有機溶媒濃度を低減することができる。したがって、特定物質 A' がタンパク質等の高次構造を有する物質である場合にも、立体
20 構造の不可逆的な変性や、失活などを抑制することができる。

さらに、柱状体 1 0 5 を電極として電位を付与することにより、被吸着物質 A を基板 1 0 1 に固定化する操作が不要となる場合がある。たとえば、被吸着物質 A をタンパク質とし、これに対するレセプターが特定物質 A' であって、タンパク質がマイナスに帯電している pH 条件でリガンドが帯電していないかあるいはプラスに帯電している場合、以下のようにして特定物質 A'
25 ' の分離を行うことができる。

まず、流路 1 0 3 に被吸着物質 A すなわちタンパク質の溶液を導入する。このとき、タンパク質はマイナスに帯電しているため、柱状体 1 0 5 を正極

として静電界を付与する。すると、タンパク質は静電相互作用により柱状体 105 表面にタンパク質が吸着する。柱状体 105 に静電界を付与しながら、流路 103 中の余分なタンパク質をバッファーにより洗い流した後、流路 103 にリガンドを含む試料を導入する。すると、タンパク質表面にリガンドが吸着するため、他の成分から分離される。そして、第一の実施形態等と同様に、流路 103 を洗浄後、塩溶液等を流すことにより、リガンドがタンパク質から脱着し、回収される。このとき、電界を付与したままりガンドを脱離させるため、タンパク質は柱状体 105 表面に吸着された状態が維持される。

- 10 以上のように、柱状体 105 に電極を形成することにより、被吸着物質 A をカップリング剤等を用いて固定化する工程が不要となるため、より簡便に分離を行うことが可能となる。なお、タンパク質がプラスに帯電しており、リガンドが帯電していないかあるいはマイナスに帯電している場合にも、柱状体 105 にマイナスの電位を付与することにより、同様にリガンドを
- 15 分離することができる。

(第四の実施形態)

- 図 6 は、本実施形態に係る分離装置 171 の構成を示す図である。分離装置 171 においては、基板 121 上に分離用流路 131 が形成され、これと交差するように投入用流路 129 および回収用流路 135 が形成されている。
- 20 投入用流路 129、分離用流路 131 および回収用流路 135 には、それぞれその両端に液溜め 125a、125b、123a、123b、127a、127b が形成されている。各々の液溜めには電極が設けられており、これを用いて例えば分離用流路 131 の両端に電圧を付与することができる。また、分離用流路 131 には、分離部 107 が設けられている。分離部 107
- 25 の構成は、第一～第三の実施形態のいずれに記載の構成としてもよい。

ここで、電極が設けられた液溜めの構造について、図 7 および図 8 を参照して説明する。図 7 は、図 1 における液溜め 123a 付近の拡大図である。また図 8 は、図 7 における B-B' 断面図である。分離用流路 131 および

液溜め 1 2 3 a が設けられた基板 1 2 1 上には、緩衝液等を注入できるようにするための開口部 1 3 9 が設けられた被覆 1 3 7 が配設される。また被覆 1 3 7 の上には、外部電源に接続することができるように電導路 1 4 1 が設けられる。さらに図 8 に示されるように、電極板 1 4 3 が液溜め 1 2 3 a の壁面と電導路 1 4 1 とに沿うように配設させる。電極板 1 4 3 と電導路 1 4 1 とは圧着され、電氣的に接続される。なお、その他の液溜めについても上記と同様な構造を有する。それぞれの液溜めに形成された電極板 1 4 3 は、基板 1 0 1 の下面等を導通させて外部電源（不図示）に接続すると、電圧が印加可能となる。

- 10 図 6 に戻り、この装置を使って試料の分離を行う方法について説明する。まず特定物質 A' を含む試料を液溜め 1 2 5 a、もしくは液溜め 1 2 5 b に注入する。液溜め 1 2 5 a に注入した場合は、液溜め 1 2 5 b の方向へ試料が流れるように電圧を印加し、液溜め 1 2 5 b に注入した場合は、液溜め 1 2 5 a の方向へ試料が流れるように電圧を印加する。これにより、試料は投入用流路 1 2 9 へと流入し、結果的に投入用流路 1 2 9 の全体を満たす。この時、分離用流路 1 3 1 上では、試料は投入用流路 1 2 9 との交点にのみ存在し、投入用流路 1 2 9 の幅程度の狭いバンドを形成している。

- 次に、液溜め 1 2 5 a、液溜め 1 2 5 b の間への電圧印加をやめ、液溜め 1 2 3 a と液溜め 1 2 3 b の間に、試料が液溜め 1 2 3 b の方向へ流れるように電圧を印加する。これにより試料は分離用流路 1 3 1 を通過することになる。分離用流路 1 3 1 中に設けられた分離部 1 0 7 において、特定物質 A' のみが被吸着物質 A と特異的に相互作用し、他の成分は液溜め 1 2 3 b へと排出される。第一、第二の実施形態と同様にして分離用流路 1 3 1 を洗浄した後、液溜め 1 2 3 a、液溜め 1 2 3 b 間への電圧印加をやめ、代わりに液溜め 1 2 7 a、液溜め 1 2 7 b の間に電圧を印加する。すると分離用流路 1 3 1 中と、回収用流路 1 3 5 の交差点に存在するバンドは、回収用流路 1 3 5 に流れこむ。液溜め 1 2 7 a、液溜め 1 2 7 b 間への電圧印加を一定時間の後に停止すると、液溜め 1 2 7 a または液溜め 1 2 7 b に、分離された

バンドに含まれる特定物質 A' が回収される。

以上の手順により、特定物質 A' が分離される。分離装置 171 は、分離用流路 131 に加えて投入用流路 129、回収用流路 135 を備えるため、不要な成分と特定物質 A' とを異なる液溜めに導くことができる。このため、液溜めに残存する不要成分の特定物質 A' への混入が抑制され、分離効率がより一層向上する。

また、液溜め 125a または液溜め 125b に反応試薬を導入することにより、回収用流路 135 中に誘導された特定物質 A' に対し、酵素反応や検出用の発色反応等、種々の反応を施すことが可能となる。

10 (第五の実施形態)

本実施形態は、目的成分の分離および濃縮、乾燥を行い、また乾燥した試料を質量分析測定に供する際の質量分析用基板として利用可能な分離装置に関する。図 12 は、本実施形態に係る分離装置 165 の構成を示す図である。分離装置 165 は、第三の実施形態に記載の分離装置 100 を基本構成とする。分離装置 100 における基板 101 が分離装置 165 における基板 133 に、流路 103 が第一の流路 157 にそれぞれ対応した構成となっており、第一の流路 157 に第一の流路 157 より幅狭の第二の流路 159 が連通している。第二の流路 159 の末端に乾燥部 161 が設けられている。第一の流路 157 および第二の流路 159 の上面には被覆 163 が設けられており、試料導入部 145、液溜め 147、および乾燥部 161 の上面が開口部となっている。さらに、第三の実施形態と同様に、試料導入部 145、液溜め 147、第一の流路 157 および乾燥部 161 の表面には金属膜（不図示）が設けられており、これらの間に電圧を付与することができる。

また、図 13 は、分離装置 165 における乾燥部 161 の構成を示す図である。図 13 (a) が上面図、図 13 (b) は図 13 (a) の D-D' 方向の断面図である。図 13 に示されるように、乾燥部 161 には複数の柱状体 167 が備えられている。また、乾燥部 161 の底面には乾燥を促進させるためのヒーター 169 が設けられている。

分離装置 1 6 5 の使用方法は以下の通りである。すなわち、まず、特定物質 A' を含む試料液体を、試料導入部 1 4 5 から注入し、毛細管効果あるいはポンプを用いた圧入などにより第一の流路 1 5 7 に展開させる。すると、分離部 1 0 7 において被吸着物質 A に対する特異的相互作用を有する特定物質 A' のみが選択的に被吸着物質層 1 0 9 に吸着する。このとき、試料導入部 1 4 5 を正極、分離部 1 0 7 を負極として通電すると、特定物質 A' の分離部 1 0 7 への誘導が促進され、好ましい。被吸着物質 A に吸着しなかった成分は、溶媒または分散媒である液体とともに液溜め 1 4 7 に導かれ、排出される。

- 5 10 次に、試料導入部 1 4 5 から流路 1 0 3 洗浄用の緩衝液等流して洗浄し、第一の流路 1 5 7 に滞留する特定物質 A' 以外の成分を除去する。このとき、特定物質 A' と被吸着物質 A とは特異的相互作用により吸着または結合しているため、これらが解離することはない。

- その後、特定物質 A' を第一および第二の実施形態と同様にして、被吸着物質 A から脱着させる。このとき、分離部 1 0 7 を正極、乾燥部 1 6 1 を負極として通電するとともに、乾燥部 1 6 1 をヒーター 1 6 9 によりたとえば 30℃ 以上 70℃ 以下に加熱すると、解離した特定物質 A' を含む液体が第二の流路 1 5 9 を経由して乾燥部 1 6 1 に導かれ、乾燥部 1 6 1 において速やかに乾燥する。乾燥部 1 6 1 には複数の柱状体 1 6 7 が設けられており、毛細管現象により効率よく第二の流路 1 5 9 中の液体が導入されるとともに、すみやかに乾燥が進行する。またこのとき、第二の流路 1 5 9 は第一の流路 1 5 7 より幅狭となっているため、第一の流路 1 5 7 から第二の流路 1 5 9 へと効率よく液体が導入される。

- 25 以上により、分離部 1 0 7 で分離された特定物質 A' が乾燥部 1 6 1 で乾燥され、回収される。

また、特定物質 A' を乾燥部 1 6 1 で乾燥させる際に MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass S

pectrometer : マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置) のマトリックスと混合することにより、MALDI-TOFMS用の試料が得られる。ここで、本実施形態で用いる質量分析装置について簡単に説明する。図11は、質量分析装置の構成を示す概略図である。

- 5 図11において、試料台上に乾燥試料が設置される。そして、真空下で乾燥試料に波長337nmの窒素ガスレーザーが照射される。すると、乾燥試料はマトリックスとともに蒸発する。試料台は電極となっており、電圧を印加することにより、気化した試料は真空中を飛行し、リフレクター検知器、リフレクター、およびニア検知器を含む検出部において検出される。
- 10 したがって、分離装置165中の液体を完全に乾燥させた後、分離装置165をMALDI-TOFMS装置の真空槽に設置し、これを試料台としてMALDI-TOFMSを行うことが可能である。ここで、乾燥部161の表面には金属膜が形成されており、外部電源に接続可能な構成となっているため、試料台として電位を付与することが可能となっている。
- 15 このように、分離装置165を用いることにより、複数の成分を含む試料中から特定物質A'のみを分離し、さらに乾燥して回収することができる。そして、乾燥した特定物質A'を、分離装置165ごとMALDI-TOFMSに供することができる。したがって、目的とする成分の抽出、乾燥、および構造解析を一枚の分離装置165上で行うことができるため、プロテオーム解析等にも有用である。
- 20

- なお、MALDI-TOFMS用のマトリックスは、測定対象物質に応じて適宜選択されるが、たとえば、シナピン酸、 α -CHCA (α -シアノー4-ヒドロキシ桂皮酸)、2,5-DHB (2,5-ジヒドロキシ安息香酸)、2,5-DHBおよびDHBs (5-メトキシサリチル酸) の混合物、
- 25 HABA (2-(4-ヒドロキシフェニルアゾ)安息香酸)、3-HPA (3-ヒドロキシピコリン酸)、ジスラノール、THAP (2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン)、IAA (トランス-3-インドールアクリル酸)、ピコリン酸、ニコチン酸等を用いることができる。

(第六の実施形態)

本実施形態は、第一の実施形態に記載の分離装置 100 を用いて抗His-Tag (ヒスチジンタグ) 抗体を用いてHis-Tagを導入したGFP (Green Fluorescent Protein) の精製を行う方法に関する。

分離装置 100 において、抗His-Tag抗体を分離部 107 の表面に固定化し、被吸着物質層 109 を形成する。固定化には、たとえば第一の実施例と同様の方法や、あるいはアフィニティークロマトグラフィー用の抗体の固定化に関する公知の方法を用いる。

10 具体的には、たとえば分離部 107 を、 $-NH_2$ 基を有するシランカップリング剤を用いて表面処理する。次に、分離部 107 にスペーサーを結合させる。スペーサーとして、たとえばEGDE (エチレングリコールジグリシジルエーテル) を用いる。スペーサーの結合は、たとえばpH 11のNaOH溶液に大過剰のEGDEを加え、たとえば30℃にて攪拌する。この溶液を分離部 107 に滴下し、たとえば24時間反応させる。その後、スペーサーの末端のエポキシ基を用いて、抗His-Tag抗体を固定化する。このとき、抗His-Tag抗体のアルカリ溶液を、スペーサーの設けられた分離部 107 に滴下し、静置する。そして、分離部を洗浄すると、分離部 107 に抗His-Tag抗体が固定化された分離装置 100 が得られる。

20 得られた分離装置 100 の試料導入部 145 に、大腸菌中で発現させたHis-Tag付加GFPを含む抽出物を導入する。すると、His-Tagを付加されたGFPのみが選択的に抗His-Tag抗体と相互作用し、被吸着物質層 109 に吸着される。流路 103 を洗浄後、分離部 107 を観察すると、GFPが吸着している領域は緑色の蛍光を発するため、目視で容易に確認することができる。

25 こうして分離されたHis-Tag付加GFPを第一の実施形態と同様にして被吸着物質層 109 から脱着させることにより、液溜め 147 からHis-Tag付加GFPを回収することができる。

なお、本実施形態においては、抗H i s - T a g抗体を用いたが、H i s - T a g結合性のニッケルカラムと同様にして、分離部107にニトリロ3酢酸などを固定化してもよい。また、本実施形態の精製方法は、第二～第五の実施形態に記載の分離装置の構成にも適用可能である。

5 (第七の実施形態)

本実施形態は、第一の実施形態に記載の分離装置100を用いて金属に対して特異的相互作用を有する物質を分離する方法に関する。

このような分離装置は以下のようにして作製する。すなわち、図17

(c)の工程に続き、基板101全面にレジスト膜を設け、分離部107となる領域のみを露出させるレジストパターンを形成する。このレジストパターンをマスクとして基板全面に金属膜を形成する。金属膜の材料は、たとえばP t、A u等水中で安定しうる物質とする。また金属膜の形成は、たとえば蒸着等により行う。そして、シリコン熱酸化膜187を溶解せずレジストマスクを溶解する剥離液を用いてレジストを除去すれば、分離部107表面に金属膜が形成される。

得られた分離装置100に金属結合性物質を含む試料を導入することにより、金属結合性物質を効率よく分離することができる。

なお、水溶液中で不安定な金属、たとえばF e、C u、A g、A l、N i、U、G e等に対して特異的相互作用する物質を分離したい場合には、これらのイオンをキレートするキレート剤やキレートタンパク質、クラウンエーテルを用い、これらにキレートさせた状態で分離部107の表面に固定化する態様とすることができる。このときの固定化は、第一の実施形態と同様にして行うことができる。また、本実施形態の分離方法は、第二～第五の実施形態に記載の分離装置の構成にも適用可能である。

25 (第八の実施形態)

本実施形態は、第一の実施形態に記載の分離装置100において、レクチンを被吸着物質Aとして用い、試料中の特定の糖鎖を分離する方法に関する。レクチンとして、たとえばC o n A (コンカナバリンA)を用いる。レクチ

ンは、単糖ではマンノースおよびグルコースに特異的なレクチンであり、また、高マンノース型の糖鎖を有する糖タンパク質や、多糖類に対する親和性を有する。

5 分離装置 100 において、ConA を分離部 107 の表面に固定化し、被吸着物質層 109 を形成する。固定化には、たとえば第一の実施例と同様の方法や、あるいはアフィニティークロマトグラフィー用の固定化レクチンに関する公知の作製方法を用いる。

具体的には、たとえば分離部 107 を、 $-NH_2$ 基を有するシランカップリング剤を用いて表面処理する。次に、分離部 107 にスペーサーを結合させる。スペーサーとして、たとえばEGDE（エチレングリコールジグリシジルエーテル）を用いる。スペーサーの結合は、たとえば pH 11 の NaOH 溶液に大過剰の EGDE を加え、たとえば 30℃ にて攪拌する。この溶液を分離部 107 に滴下し、たとえば 24 時間反応させる。その後、スペーサーの末端のエポキシ基を用いて、レクチンを固定化する。このとき、たとえば
15 $-SH$ 基、 $-OH$ 基、 $-NH_2$ を含むレクチンのアルカリ溶液を、スペーサーの設けられた分離部 107 に滴下する。

得られた分離装置 100 を用いることにより、高マンノース型の糖鎖を有する糖タンパク質または多糖類の有無を簡便に高精度、高感度で分離し、回収することが可能である。分離装置 100 の分離部 107 には、レクチンと
20 基板 101 表面との間にスペーサーが設けられているため、レクチンと糖鎖との特異的相互作用が容易になる。したがって、より効率よく分離を行うことができる。なお、本実施形態の分離方法は、第二～第五の実施形態に記載の分離装置の構成にも適用可能である。

以上、本発明を実施形態に基づき説明した。これらの実施形態は例示であり、各構成要素や各製造工程の組合せにいろいろな変形例が可能なこと、また
25 そうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

たとえば、本実施形態に係る分離装置を次のように構成することもできる。

図 18 は、毛細管現象を利用して試料を移動させる方式の分離装置の構成を示す図である。毛細管現象を利用することにより、電力、圧力等の外力の印加が不要で駆動のためのエネルギーが不要となる。図 18 において、基板 5

50 に設けられた分離用流路 540 には、第一の実施形態に記載の分離部
5 (不図示) が形成されている。分離用流路 540 の一端には空気穴 560 が設けられ、他端には分離時にバッファを注入するためのバッファ注入口 510 が設けられている。分離用流路 540 は、バッファ注入口 510、空気穴 560 以外の部分では密閉されている。分離用流路 540 の起始部には、サンプル定量管 530 がつながっており、サンプル定量管 530 の他方
10 の端は、サンプル注入口 520 が設けられている。

図 20 は、サンプル定量管 530 の近傍を拡大して示したものである。サンプル定量管 530 内部、サンプル保持部 503、およびバッファ導入部 504 には、親水性の吸収領域が設けられる。また分離用流路 540 への導入口付近にも吸収領域 506 が設けられる。サンプル定量管 530 とサンプル保持部 503 との間には、一時停止スリット 502 が設けられている。一
15 時停止スリット 502 は疎水性領域とすることができる。各吸収領域の間は、一時停止スリット 505 および 507 で隔てられている。サンプル保持部 503 の空隙体積は、サンプル定量管 530 の空隙体積と一時停止スリット 502 の体積の和にほぼ等しい。一時停止スリット 505 の幅は、一時停止ス
20 リット 502 の幅よりも狭い。ここで、サンプル定量管 530 は、親水性の機能を有し、試料の導入部としての機能が果たせるように構成される。

次に、図 18 の装置を用いた分離操作の手順について説明する。まず、サンプル注入口 520 にサンプルを徐々に注入しサンプル定量管 530 を満たす。この時、水面が盛り上がらないようにする。サンプル定量管 530 がサ
25 ンプルで満たされた後、サンプルは一時停止スリット 502 に徐々にしみ出してゆく。一時停止スリット 502 にしみだしたサンプルが、サンプル保持部 503 の表面に到達すると、一時停止スリット 502 およびサンプル定量管 530 の内部のサンプルは、さらに毛細管効果の大きい、サンプル保持部

5 0 3へとすべて吸い取られる。ここで、各吸収領域は、親水性材料の選択により、親水性の度合いが異なるように形成され、サンプル保持部 5 0 3 は、サンプル定量管 5 3 0 よりも大きい毛細管効果を有する。サンプル保持部 5 0 3 へのサンプル充填の間は、一時停止スリット 5 0 5、5 0 7 が存在する
5 ため、サンプルがバッファー導入部 5 0 4 に流れ込むことは無い。

サンプル保持部 5 0 3 にサンプルが導入された後、バッファー注入口 5 1 0 に分離用バッファーを注入する。注入されたバッファーは、バッファー導入部 5 0 4 に一時的に充填されて、サンプル保持部 5 0 3 との界面が直線状になる。さらにバッファーが充填されると、一時停止スリット 5 0 5 にしみ
10 だして、サンプル保持部 5 0 3 に流入し、さらに、サンプルをひきずりながら、一時停止スリット 5 0 7 を超えて分離用流路の方向へと進行する。この際、一時停止スリット 5 0 2 の幅が、一時停止スリット 5 0 5、5 0 7 の幅よりも大きいため、一時停止スリット 5 0 2 へバッファーが逆流しても、サンプルは既に、サンプル保持部 5 0 3 より先に進行しているため、サンプル
15 の逆流はほとんどない。

分離用バッファーは毛細管現象で、分離用流路を空気穴 5 6 0 へ向けてさらに進行し、この過程で、サンプルが分離される。分離用バッファーが、空気穴 5 6 0 に到達すると、バッファーの流入が停止する。バッファーの流入が停止した段階、もしくは、バッファーが進行中の段階で、サンプルの分離
20 状態を計測する。

上記実施形態は、毛細管現象を用いた分離装置の例であるが、この原理を利用した試料注入の他の例について図 1 9 および図 2 1 を参照して説明する。この装置では、図 1 8 におけるサンプル定量管 5 3 0 に代えて、サンプル投入管 5 7 0 が設けられている。サンプル投入管 5 7 0 の両端には、サンプル
25 注入口 5 2 0 と、排出口 5 8 0 が設けられている。

この装置を用いた分離手順について説明する。まず、サンプルを、サンプル注入口 5 2 0 に投入し、排出口 5 8 0 まで満たす。この間に、サンプルは、投入穴 5 0 9 を介してサンプル保持部 5 0 3 に吸収される。

しかる後に、サンプル注入口 5 2 0 に空気を圧入して、サンプルを排出口 5 8 0 から排出することによりサンプル投入管 5 7 0 の内部のサンプルを払拭、乾燥する。毛細管現象による分離の場合は、上記と同様に、分離用バッファを注入する。電気泳動による分離の場合は、サンプルの投入以前に、

5 バッファ注入口 5 1 0 に相当する液溜め、空気穴 5 6 0 に相当する液溜めから泳動用バッファを導入しておく。広く作られた一時停止スリット 5 0 5、5 0 7 が存在するため、サンプル保持部には、流入しない。

サンプル保持部 5 0 3 へのサンプルの保持が終わった段階で、さらに微量の泳動用バッファを分離用流路の一端の液溜めに加えるか、サンプル保持

10 部 5 0 3 の周辺に軽く振動を与えることで、泳動バッファを連続させ、電圧を印加して分離する。

なお、図 2 2 は本実施形態の分離装置を含む質量分析システムのブロック図である。このシステムは、図 2 2 (a) に示すように、試料 1 0 0 1 について、夾雑物がある程度除去する精製 1 0 0 2、不要成分 1 0 0 4 を除去する分離 1 0 0 3、分離した試料の前処理 1 0 0 5、前処理後の試料の乾燥 1

15 0 0 6、質量分析による同定 1 0 0 7、の各ステップを実行する手段を備えている。

ここで、以上の実施形態で説明した分離装置による分離は、分離 1 0 0 3 のステップに対応しており、マイクロチップ 1 0 0 8 上で行われる。また、

20 精製 1 0 0 2 のステップにはたとえば血球等の巨大成分のみを除去するための分離装置等を用いる。前処理 1 0 0 5 では、上述のトリプシン等を用いた低分子化、マトリックスとの混合等を行う。乾燥 1 0 0 6 では、前処理の施された試料を乾燥し、質量分析用乾燥試料を得る。

また、本実施形態に係る分離装置は流路を有しているため、図 2 2 (b) に示すように、精製 1 0 0 2 から乾燥 1 0 0 6 までのステップを一枚のマイクロチップ 1 0 0 8 上で行うこともできる。試料をマイクロチップ 1 0 0 8 上で連続的に処理することにより、微量の成分についても損出が少ない方法で効率よく確実に同定を行うことが可能となる。

このように、図 2 2 に示される試料の処理のうち、適宜選択したステップまたはすべてのステップをマイクロチップ 1 0 0 8 上にて行うことが可能となる。

(実施例)

- 5 以下、本発明を DNA と RNA の組み合わせを例にした実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

第一の実施の形態で説明した方法で流路 1 0 3 の表面に柱状体 1 0 5 が形成された反応装置 1 0 0 (図 1) を製造する。基板 1 0 1 は、(1 0 0) 面を主面とするシリコン基板により構成する。分離部 1 0 7 に、柱状体 1 0 5
10 (図 2) を設ける。柱状体 1 0 5 は、図 1 5 ~ 図 1 7 を用いて説明した方法で形成する。ここでは、柱状体 1 0 5 の間隔 p が約 2 0 0 nm となるようにする。

次に、柱状体 1 0 5 であるシリコンピラーの表面に、カップリング剤を用いて線虫 (C. エレガンス: *Caenorhabditis elegans*) の *t p a - 1* 遺伝子の一部に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド A
15 をシリコンピラー表面に固定する。

A : 5' - SH - T C G A T T T T C A A A C C G T T T C C - 3' (配列番号 1)

ここで、アンチセンスオリゴヌクレオチド A は 5' 末端が SH 基により修飾されている。
20

具体的には、図 1 において分離部 1 0 7 の表面に、アンチセンスオリゴヌクレオチド A のチオール基と結合する化合物として、アミノシランの一種である N - (2 - アミノエチル) - 3 - アミノプロピルトリメトキシシラン (EDA) を固定する。

25 このとき、分離部 1 0 7 を 1 : 1 の濃 HCl : CH₃OH に約 3 0 分間浸し、蒸留水で洗浄した後、濃 H₂SO₄ に約 3 0 分間浸す。そして、蒸留水で洗浄した後、脱イオン水中で数分間煮沸させる。つづいて、1 % EDA (1 mM 酢酸水溶液中) 等のアミノシランを分離部 1 0 7 に導入し、室温で

約20分間反応させる。これにより、分離部107の表面にEDAが固定される。その後、蒸留水で残さを洗浄し、不活性ガス雰囲気下にて約120℃で3～4分加熱して乾燥させる。

つづいて、二官能性のクロスリンカーとして、1mMのスクシンイミジル
5 4-(マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)溶液を準備し、少量のDMSOに溶解させた後、希釈する。分離部107をこの希釈溶液に室温で2時間浸し、希釈溶媒で洗浄した後不活性ガス雰囲気下で乾燥する。

これにより、SMPBのエステル基がEDAのアミノ基と反応し、分離部
107表面にマレイミドが露出した状態となる。このような状態で、分離部
10 107に、チオール基が付いたアンチセンスオリゴヌクレオチドAを導入する。こうすると、アンチセンスオリゴヌクレオチドAのチオール基と分離部
107の表面のマレイミドとが反応し、アンチセンスオリゴヌクレオチドAが分離部107の表面に固定される(たとえばChrisseyら、Nucleic
Acids Research、1996年、Vol. 24、No.
15 15、3031頁～3039頁)。これにより、流路103および柱状体105の表面に、アンチセンスオリゴヌクレオチドAを固定することができる。

以上の手順により、分離装置100が得られる。得られた分離装置100を用いて、RNAの分離を行う。

線虫から抽出したRNAをハイブリダイゼーション溶液(Rapid hybridization buffer (Amersham社製)と混合
20 する。

試料導入部145よりサンプルを導入し、調湿箱内で、70℃で2時間反応した後、2×SSC(標準食塩クエン酸緩衝液)、0.1%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)で室温15分、続いて0.2×SSC、0.1%SDSで65℃15分の洗浄を行う。次にDEPC(Diethylprocar
25 bionate)処理水を試料導入部145より導入し、液溜め147に押し出された液の除去と液溜め147の洗浄を行う。そして、80℃で変性を行い、急冷により分離部107に固定化されたDNAとRNAを分けた後、

溶液部分を液溜め 1 4 7 に回収すると、t p a - 1 遺伝子由来の R N A を高率に含有する溶液が得られる。

このように本実施例によれば、R N A 混合物から特定の配列を持つ R N A を良好に分離することができる。

請 求 の 範 囲

1. 基材と、該基材に設けられた試料が流れる流路と、該流路に設けられ、前記試料中の特定物質を分離する分離部と、該分離部に設けられ、前記流路よりも幅狭の微細流路と、を含み、前記分離部に前記特定物質と選択的に吸着または結合する被吸着物質の層が形成されていることを特徴とする分離装置。
5
2. 基材と、該基材に設けられた試料が流れる流路と、該流路に設けられ、前記試料中の特定物質を分離する分離部と、該分離部に設けられた突起部と、
10 を含み、前記分離部に前記特定物質と選択的に吸着または結合する被吸着物質の層が形成されていることを特徴とする分離装置。
3. 請求の範囲第1項または第2項に記載の分離装置において、前記分離部および前記流路に電極が設けられ、前記電極間に電圧を付与する電圧付与手段をさらに備えることを特徴とする分離装置。
- 15 4. 請求の範囲第1項乃至第3項いずれかに記載の分離装置において、前記分離部に突起部が設けられ、該突起部に電極が形成されていることを特徴とする分離装置。
5. 請求の範囲第1項乃至第4項いずれかに記載の分離装置において、前記特定物質と前記被吸着物質との組み合わせが、抗原と抗体、酵素と基質、
20 酵素と基質誘導体、酵素と阻害剤、糖とレクチン、DNAとDNA、DNAとRNA、タンパク質と核酸、金属とタンパク質またはリガンドとレセプター、のいずれかの組み合わせであることを特徴とする分離装置。
6. 請求の範囲第1項乃至第5項いずれかに記載の分離装置において、前記被吸着物質がスパーサーを介して前記基材の表面に備えられたことを特徴
25 とする分離装置。
7. 基材に設けられた流路と、該流路に設けられた分離部と、該分離部に設けられ、前記流路よりも幅狭の微細流路と、を含む分離装置の分離部に、分離対象物質に選択的に吸着または結合する被吸着物質と異なる符号の電圧

を印加しながら、

前記流路に前記被吸着物質を含む液体を導入し、前記分離部に吸着させるステップと、

5 前記流路に前記分離対象物質を含む試料を導入し、前記被吸着物質に選択的に吸着または結合させるステップと、

前記流路に前記分離対象物質を前記被吸着物質から脱離させる脱離液を導入し、前記分離対象物質を脱離させ、回収するステップと、

を行うことを特徴とする分離方法。

8. 基材に設けられた流路と、該流路に設けられた分離部と、該分離部に
10 設けられた突起部と、を含む分離装置の分離部に、分離対象物質に選択的に吸着または結合する被吸着物質と異なる符号の電圧を印加しながら、

前記流路に前記被吸着物質を含む液体を導入し、前記分離部に吸着させるステップと、

15 前記流路に前記分離対象物質を含む試料を導入し、前記被吸着物質に選択的に吸着または結合させるステップと、

前記流路に前記分離対象物質を前記被吸着物質から脱離させる脱離液を導入し、前記分離対象物質を脱離させ、回収するステップと、

を行うことを特徴とする分離方法。

9. 生体試料を分子サイズまたは性状に応じて分離する分離手段と、

20 前記分離手段により分離された試料に対し、酵素消化処理を含む前処理を行う前処理手段と、

前処理された試料を乾燥させる乾燥手段と、

乾燥後の試料を質量分析する質量分析手段と、

を備え、

25 前記分離手段は、請求の範囲第1項乃至第6項いずれかに記載の分離装置を含むことを特徴とする質量分析システム。

Fig.1

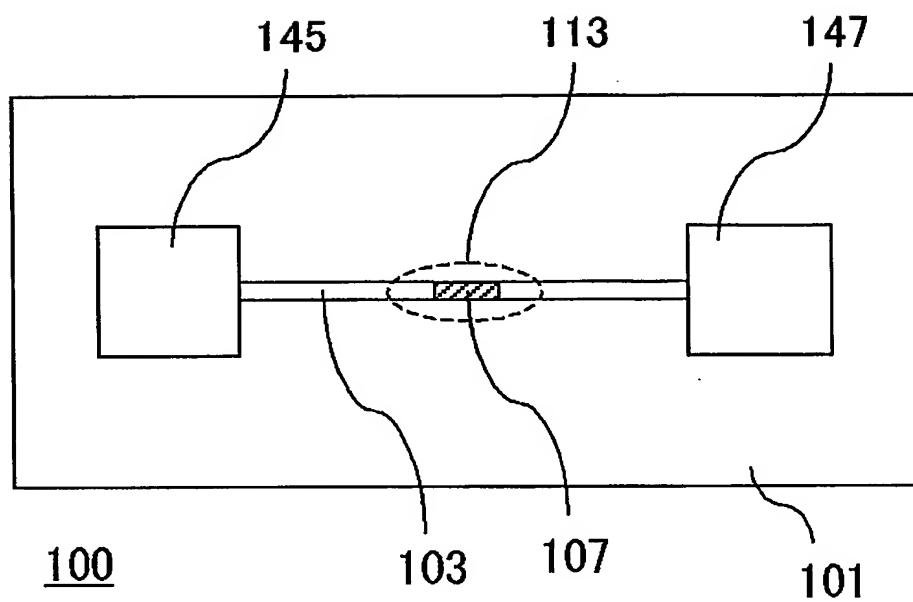
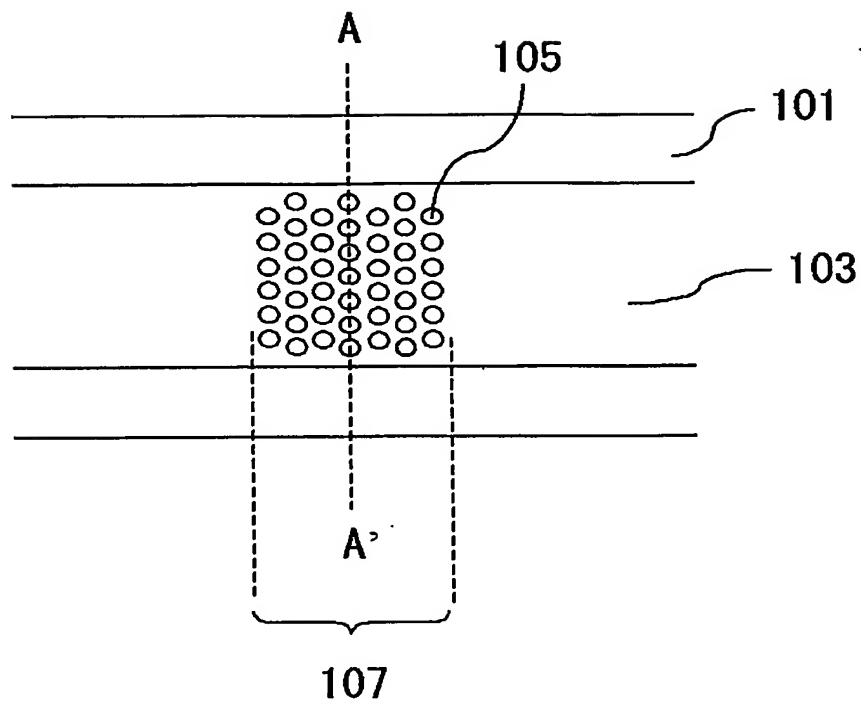


Fig.2

(a)



(b)

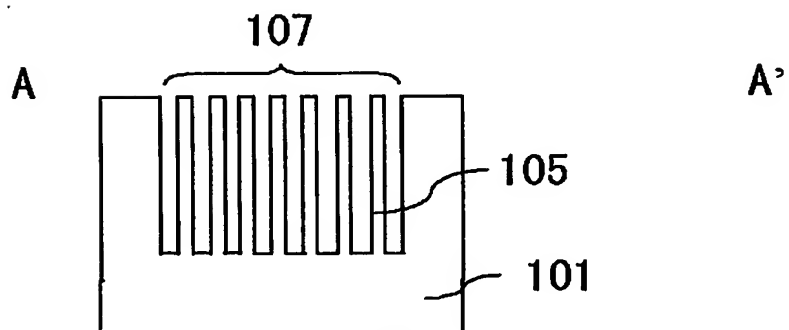
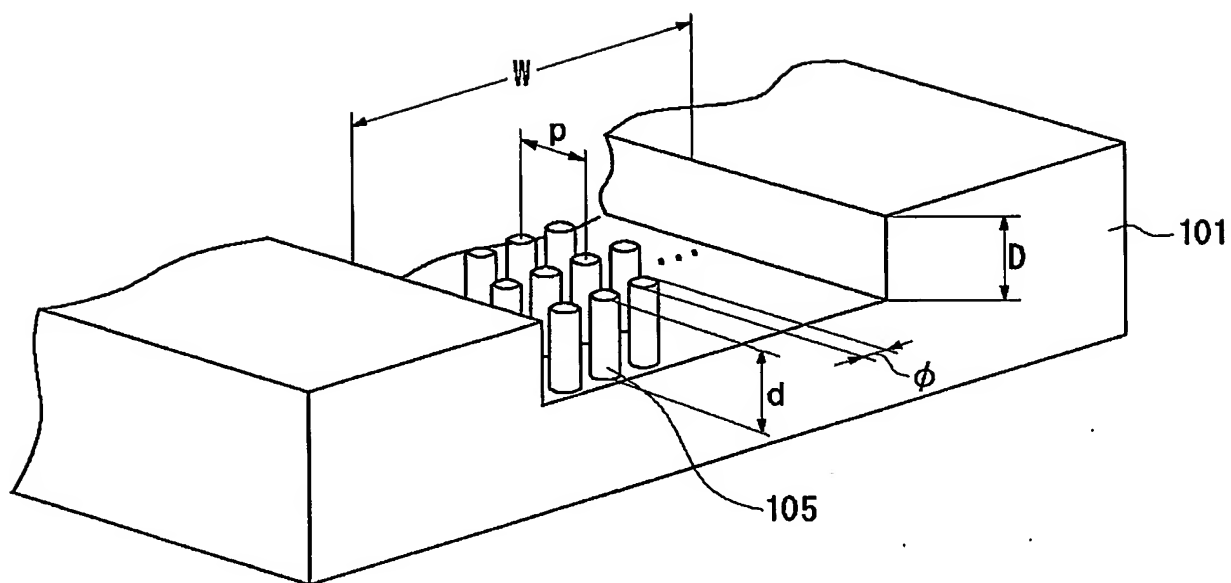


Fig.3



| | |
|--------|-------------------------|
| W | 10 ~ 5000 μm |
| D | 50nm ~ 10 μm |
| ϕ | 10nm ~ 10 μm |
| d | 10nm ~ 10 μm |
| p | 1nm ~ 10 μm |

Fig.4

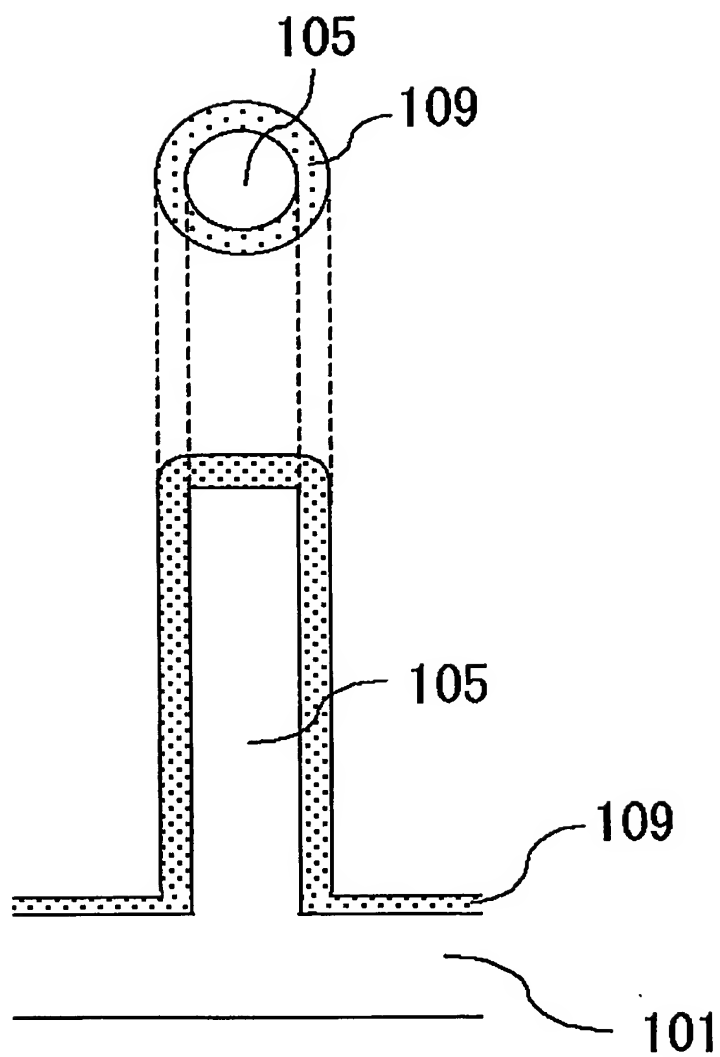


Fig.5

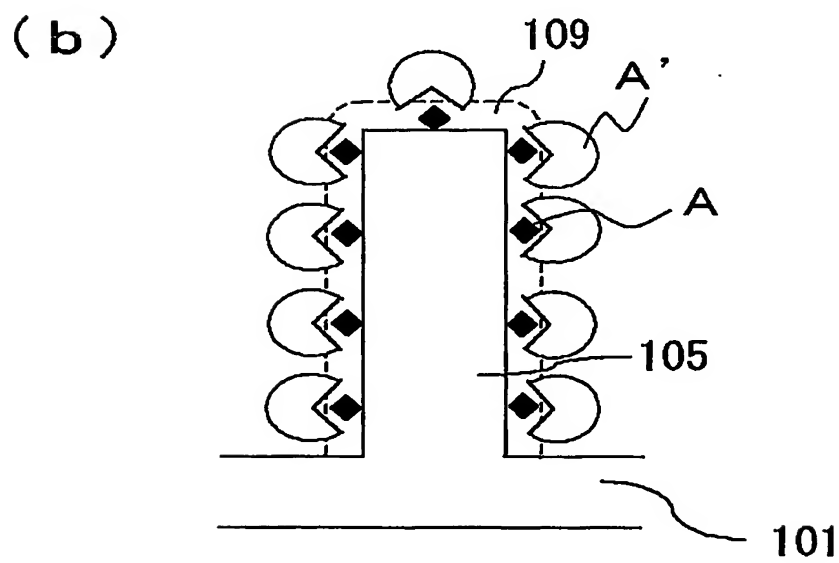
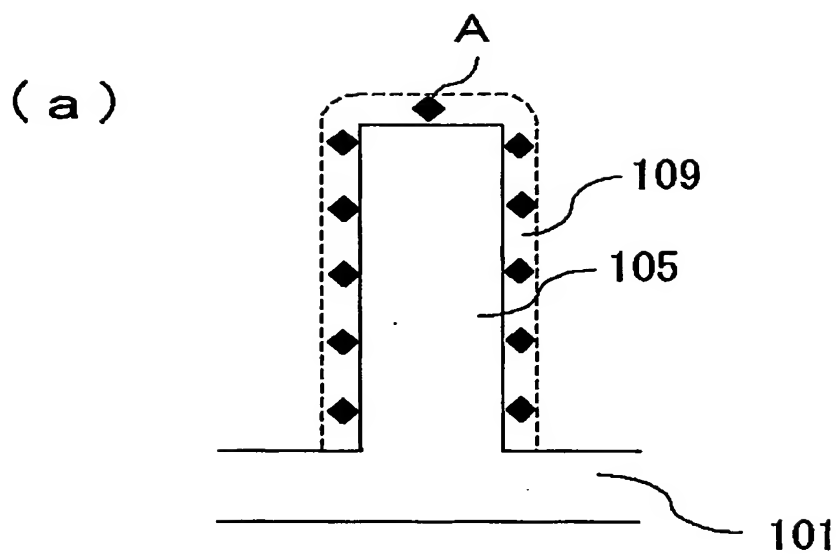


Fig.6

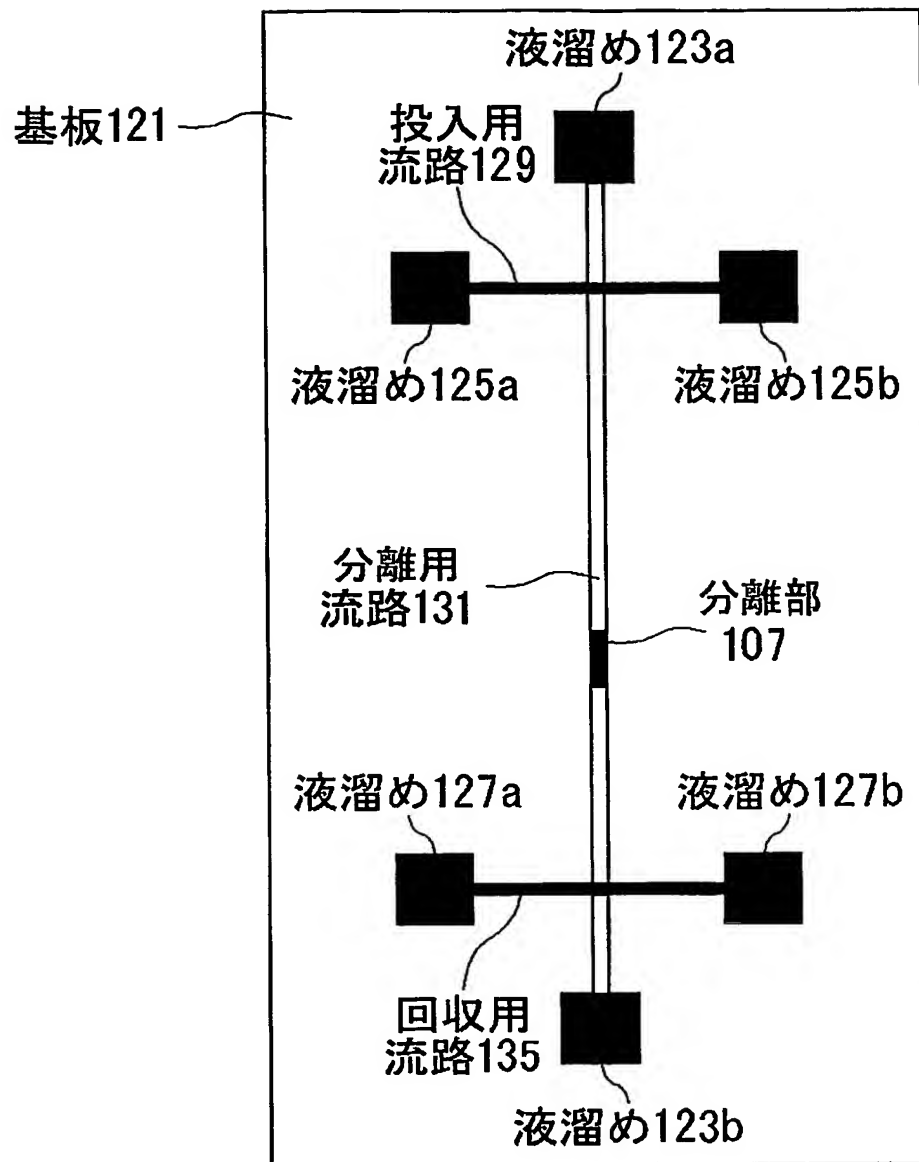


Fig.7

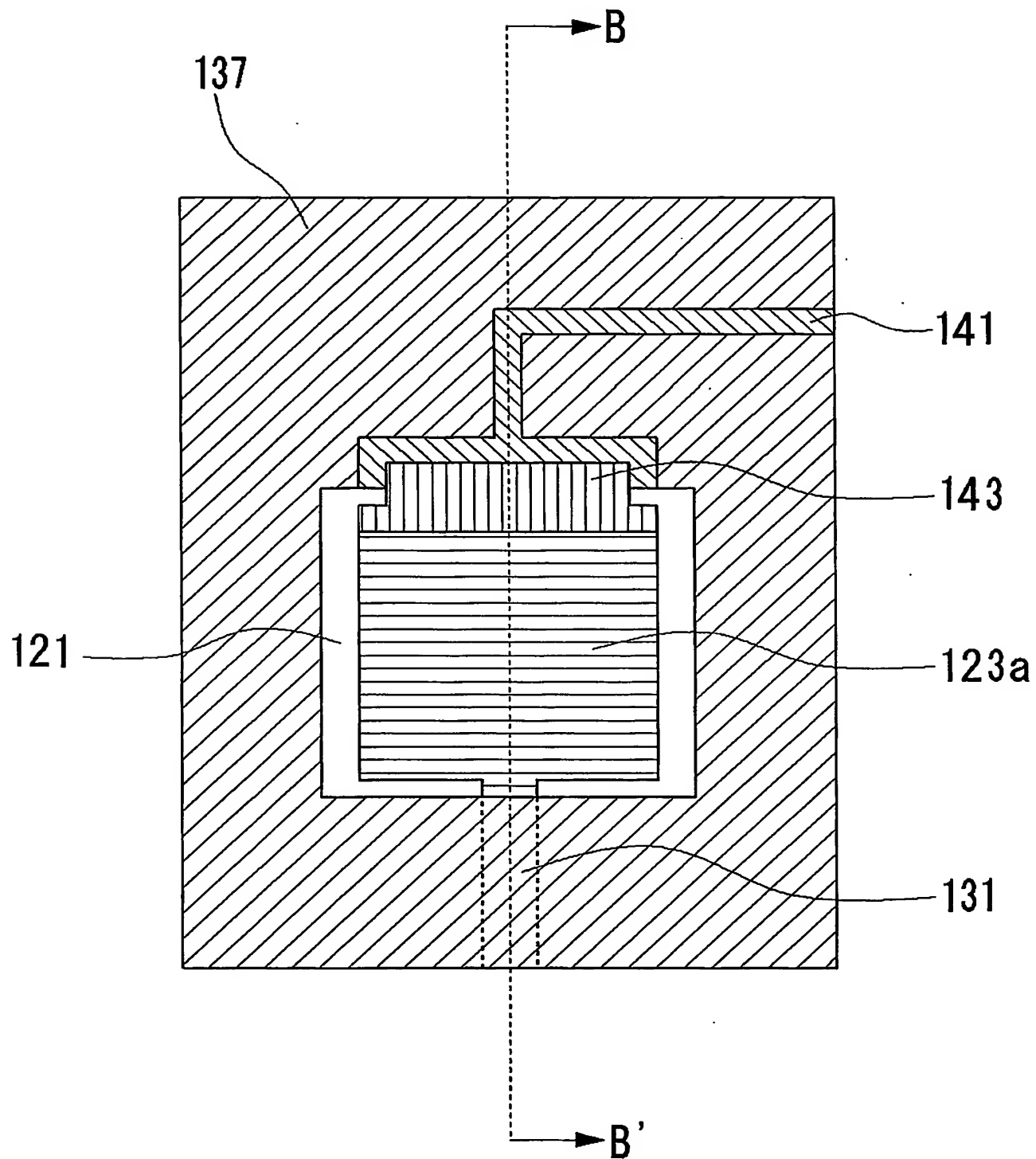


Fig.8

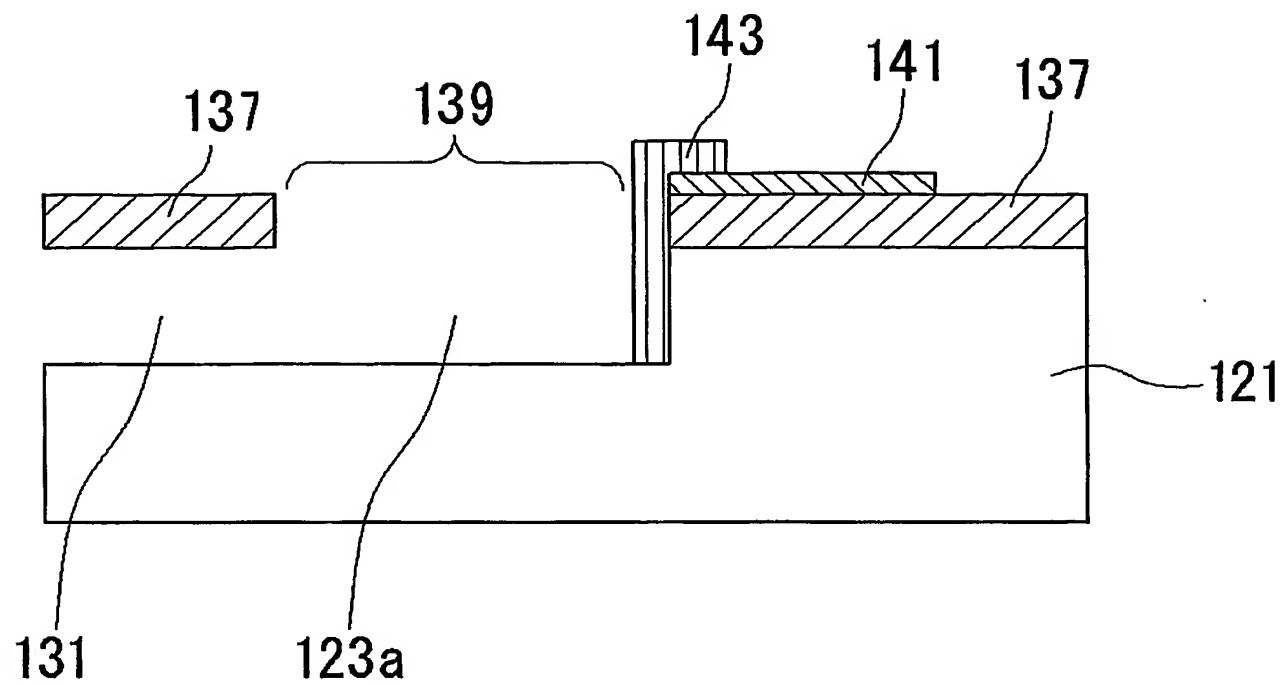
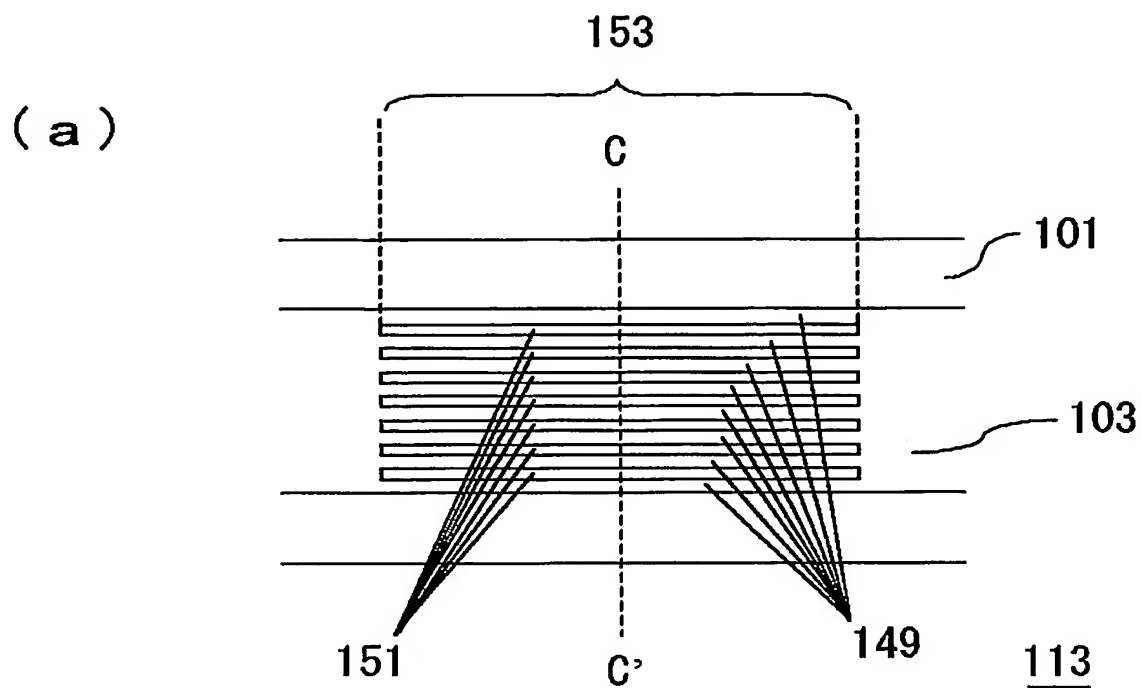


Fig.9



(b)

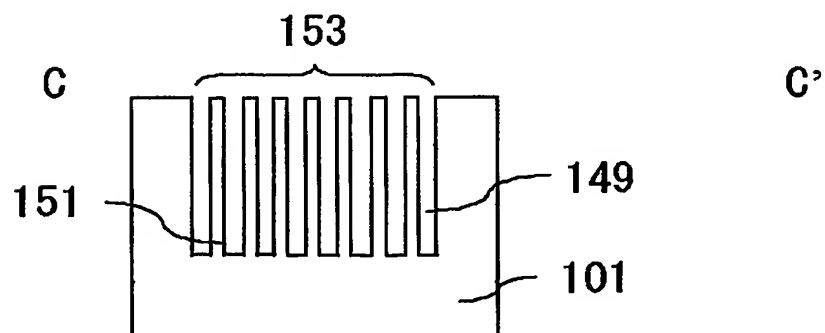


Fig.10

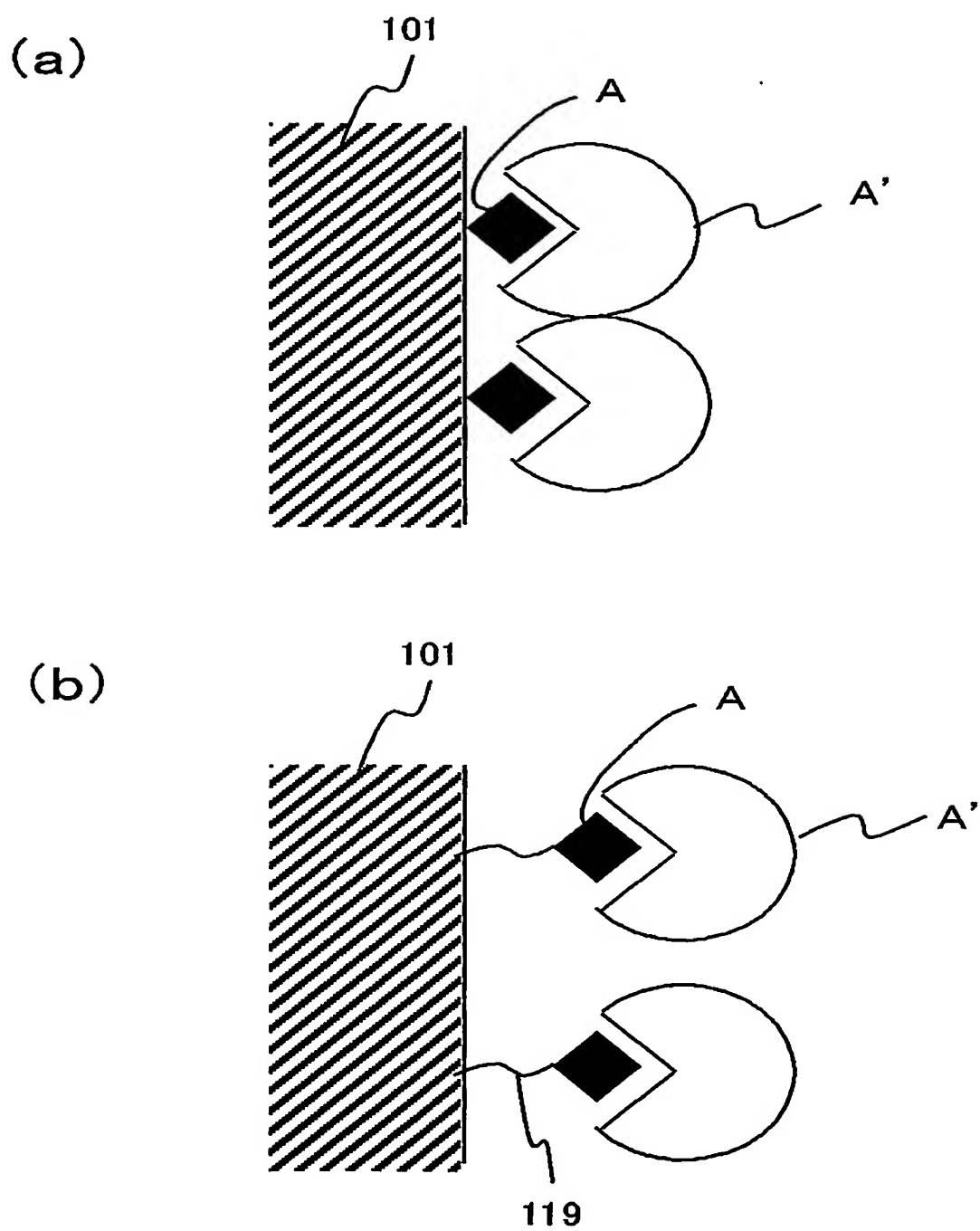


Fig.11

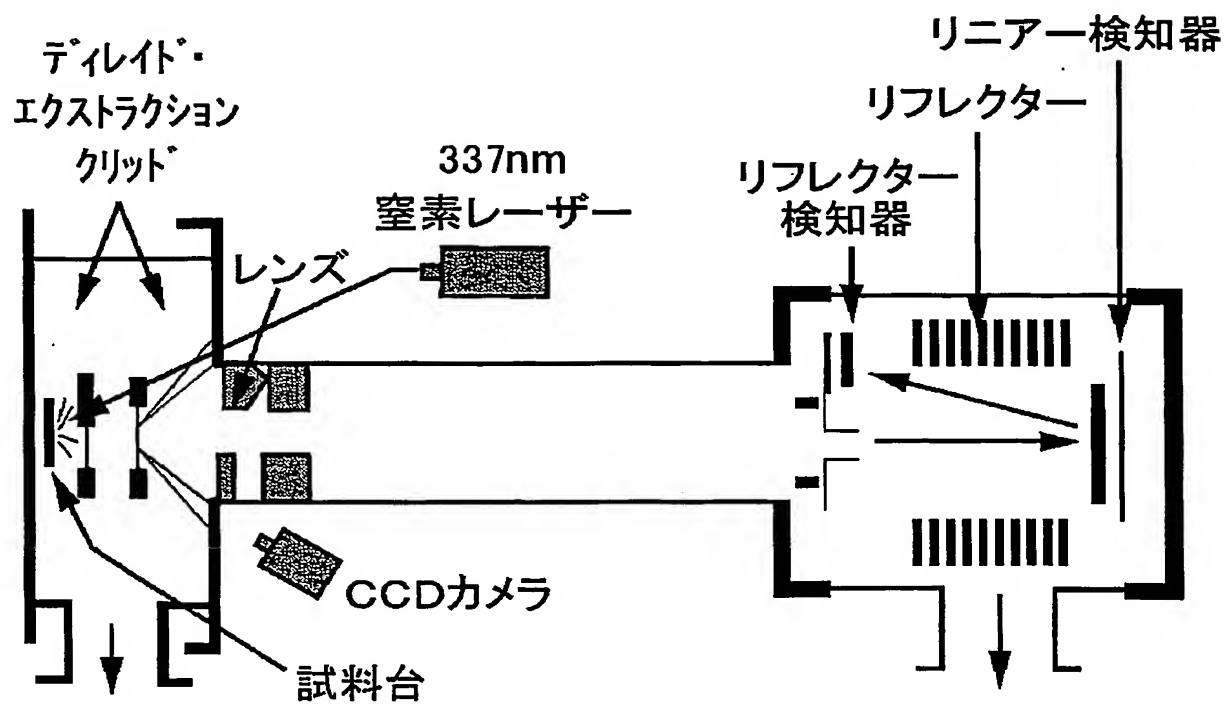


Fig.12

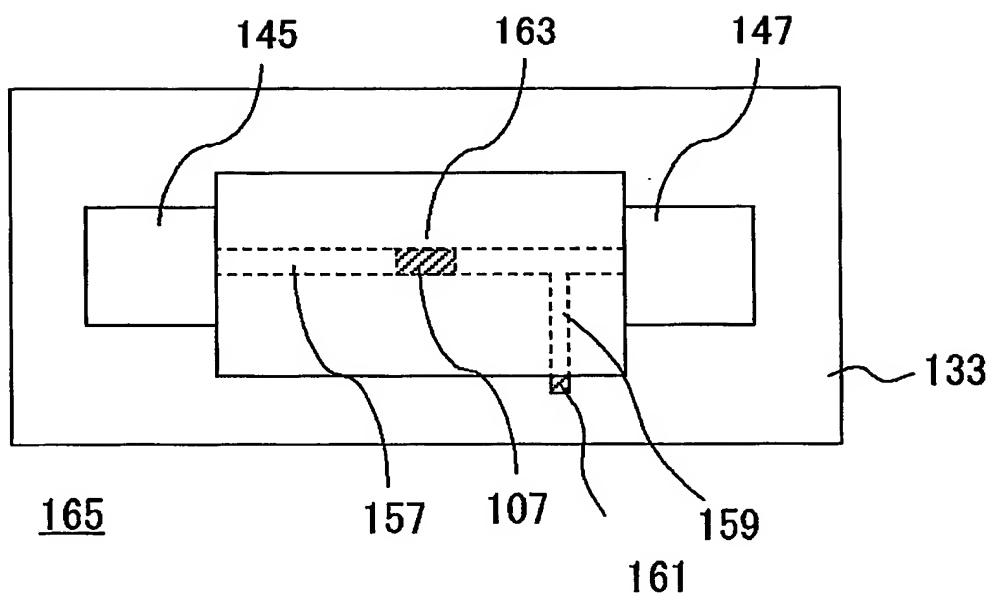
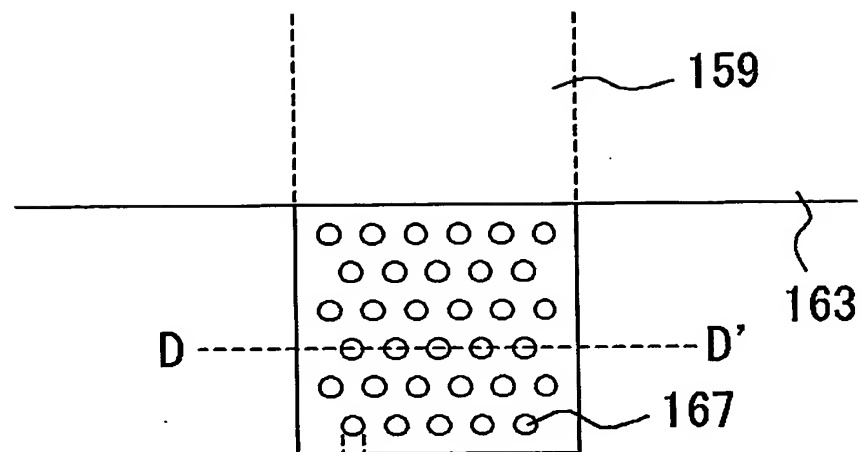


Fig.13

(a)



(b)

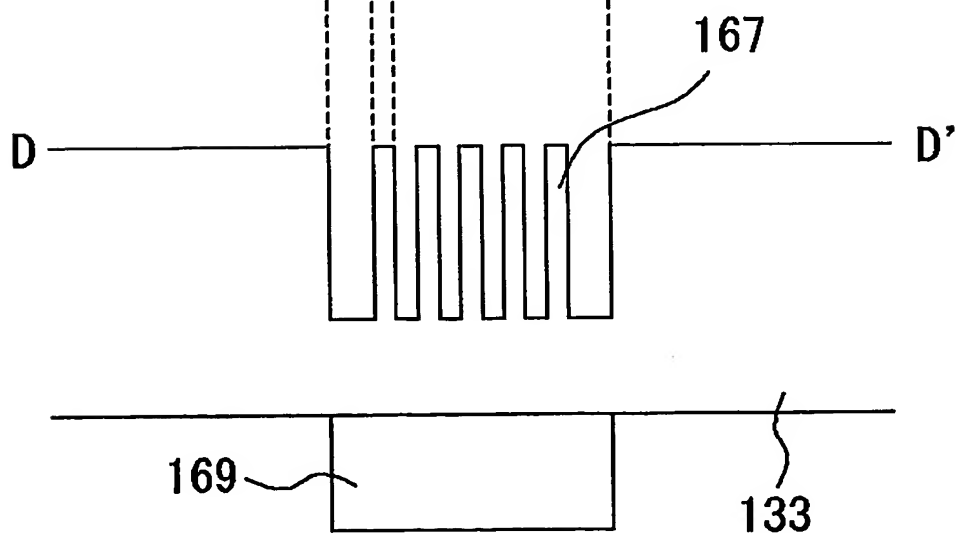


Fig.14

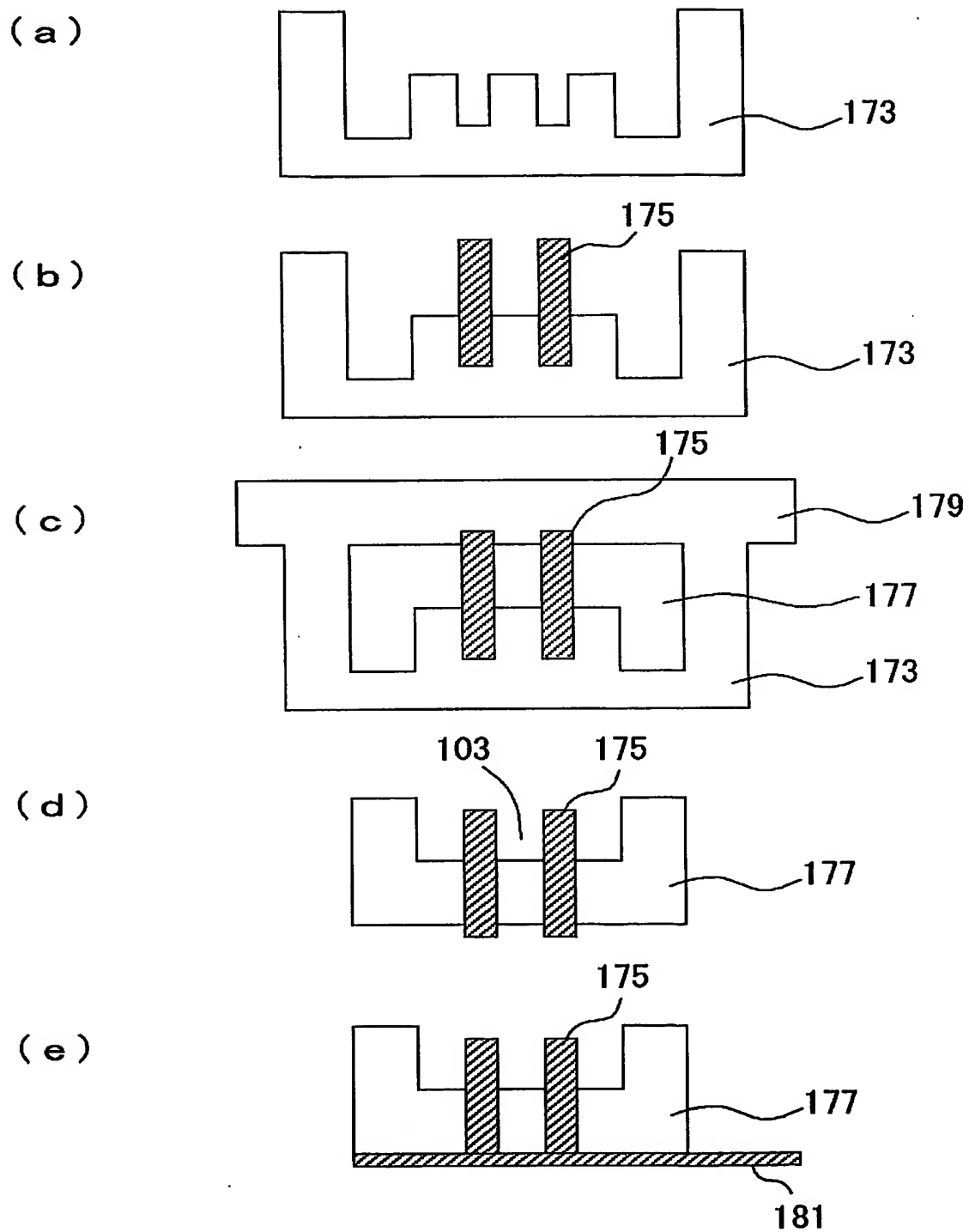
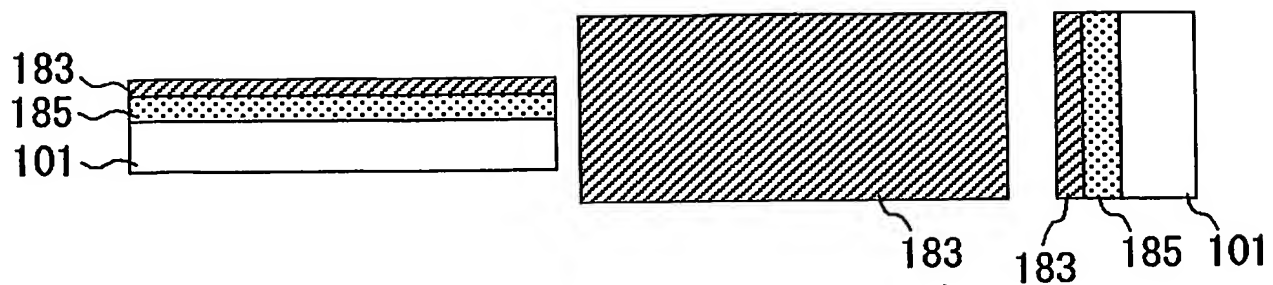
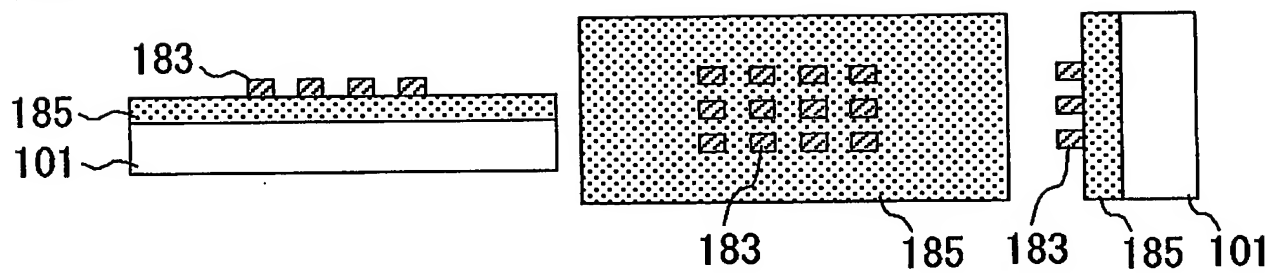


Fig.15

(a)



(b)



(c)

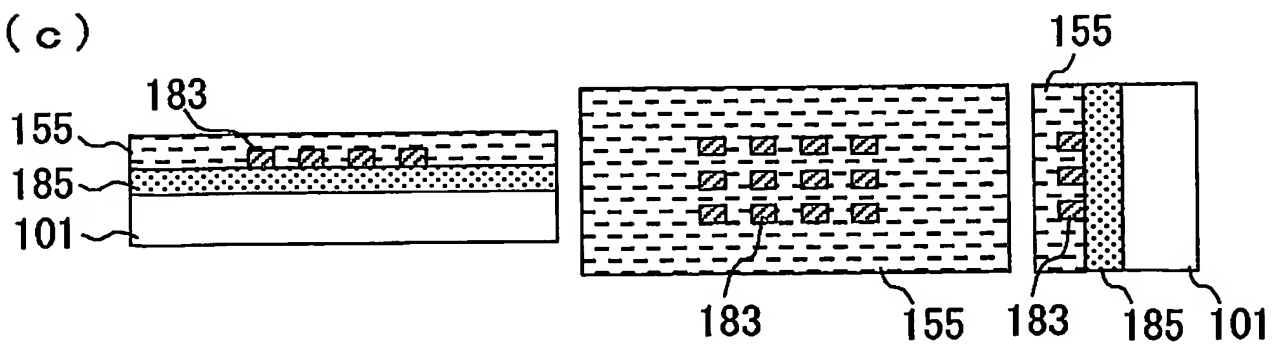
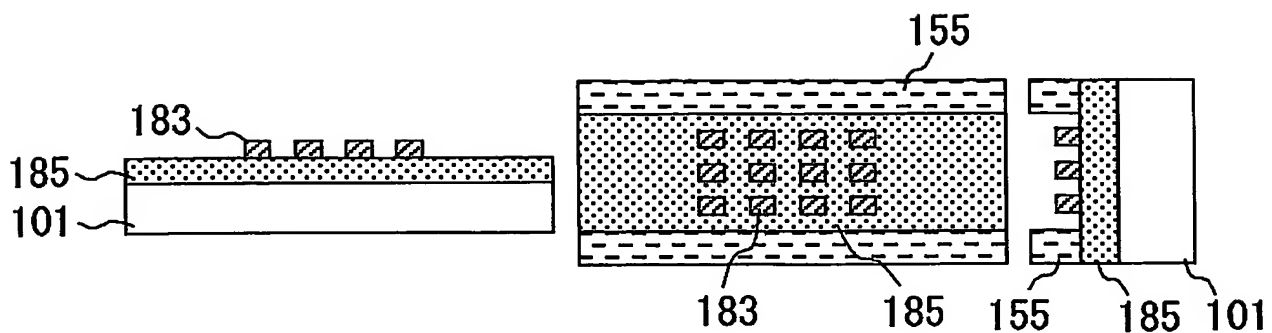
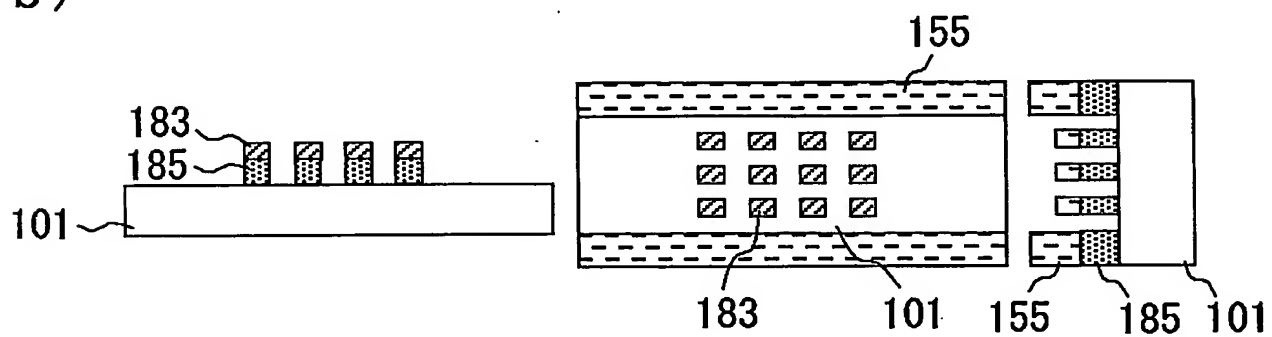


Fig.16

(a)



(b)



(c)

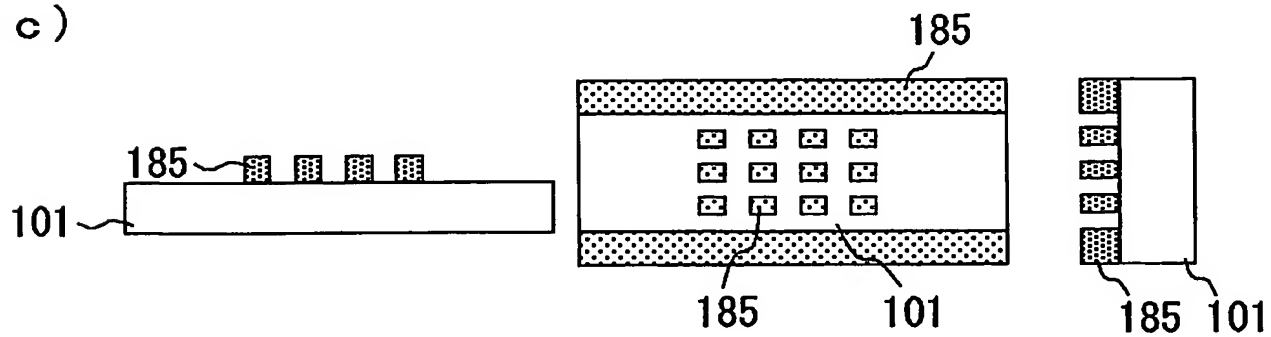
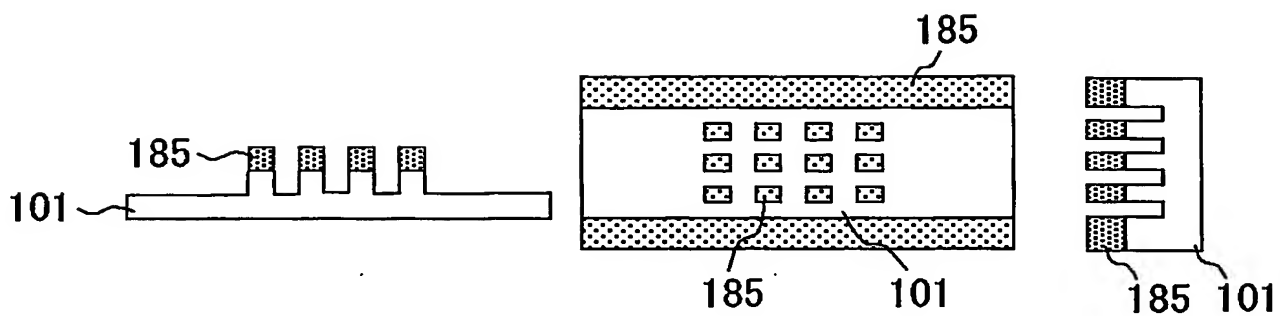
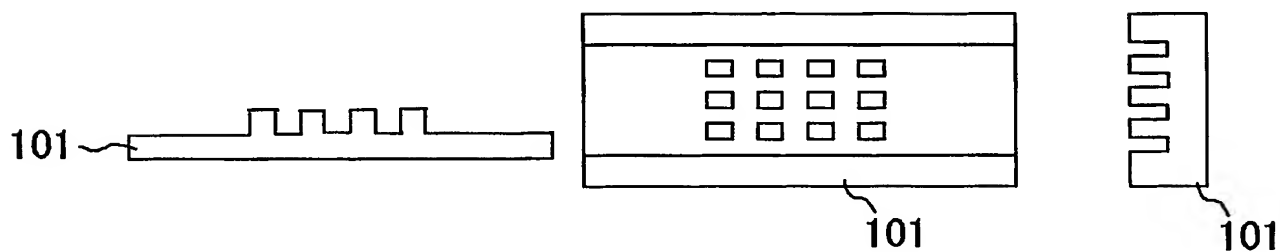


Fig.17

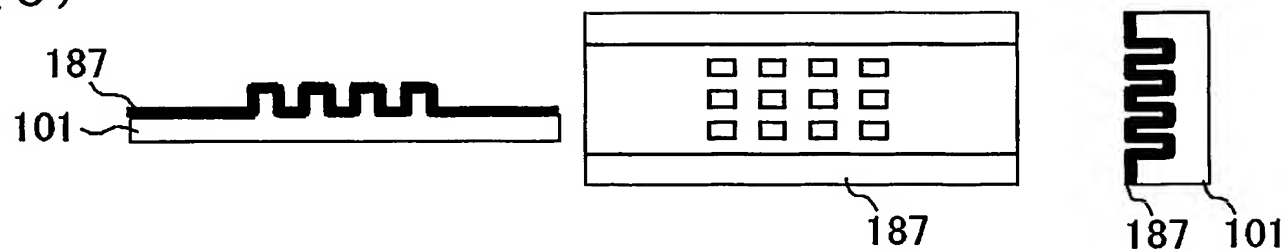
(a)



(b)



(c)



(d)

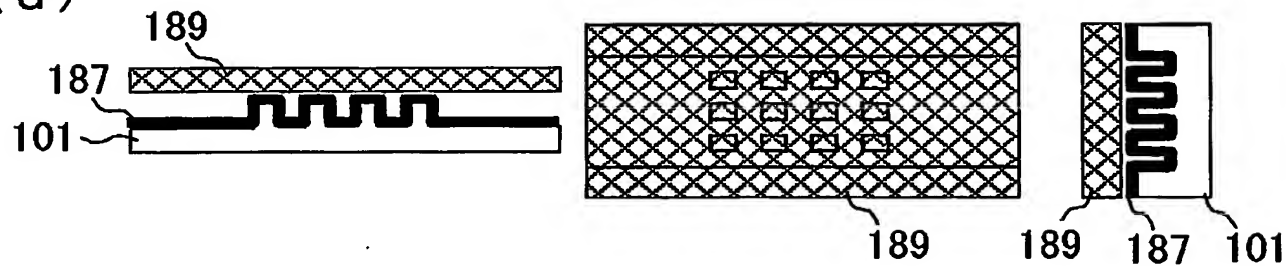


Fig.18

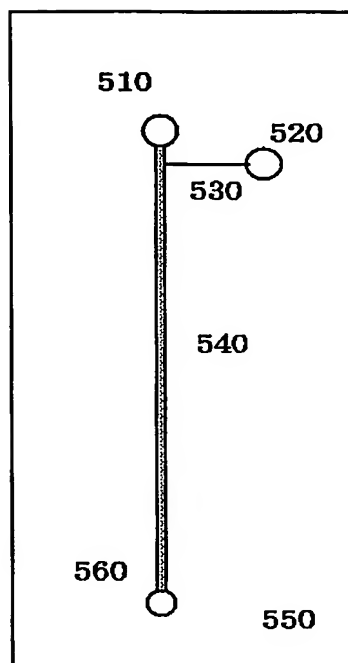


Fig.19

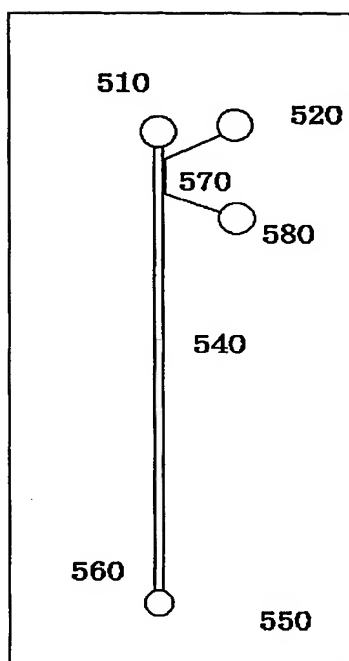


Fig.20

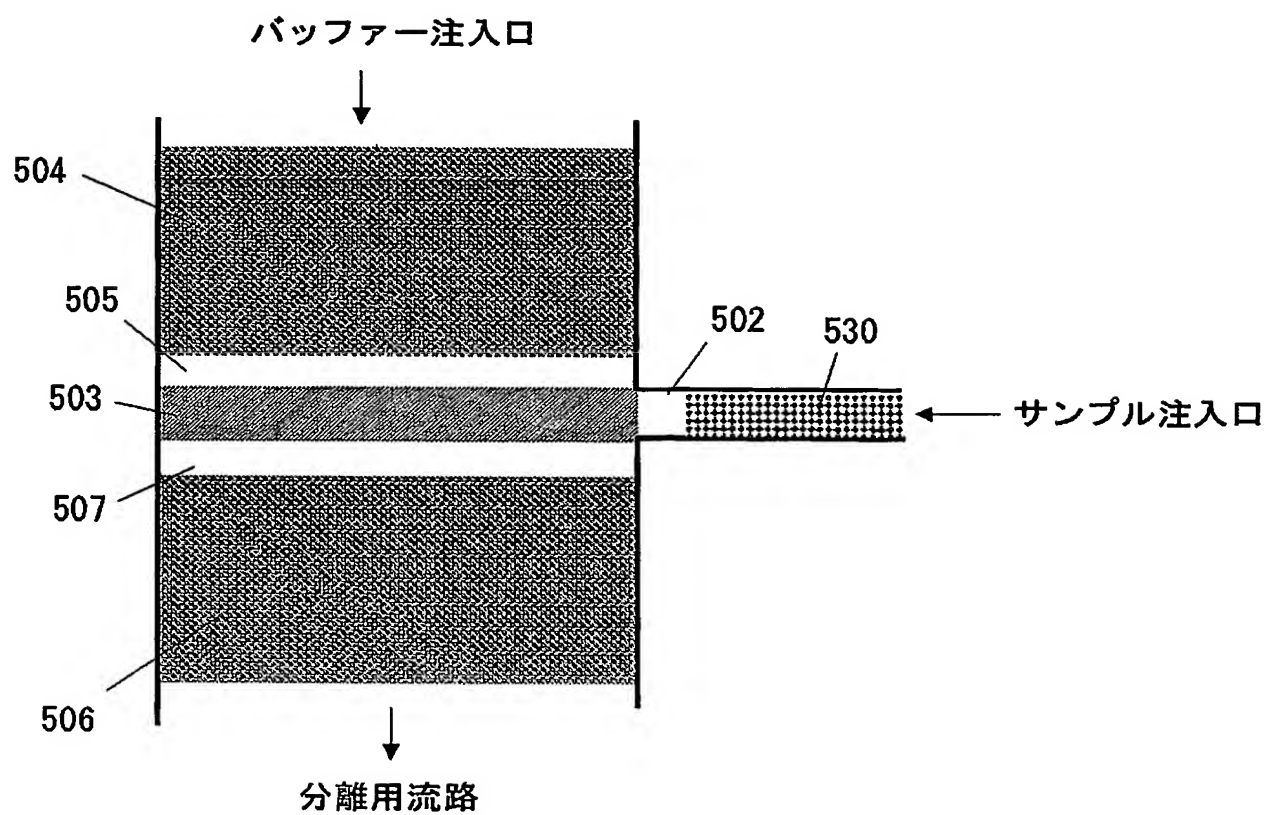


Fig.21

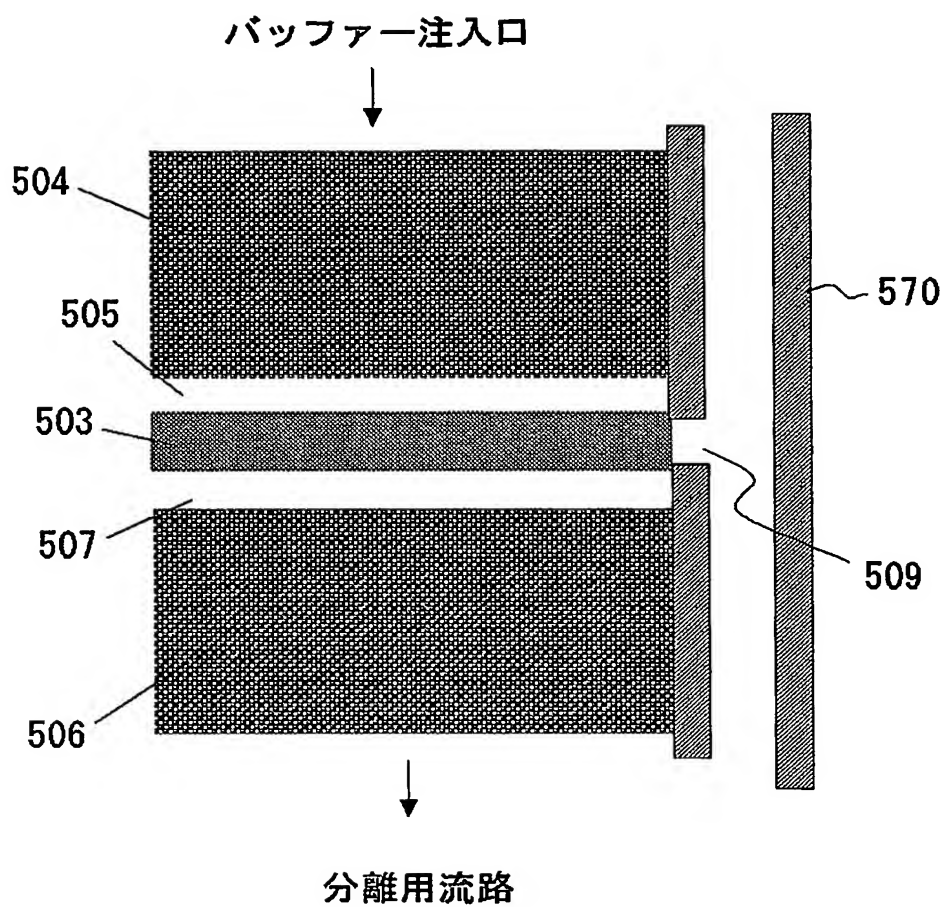
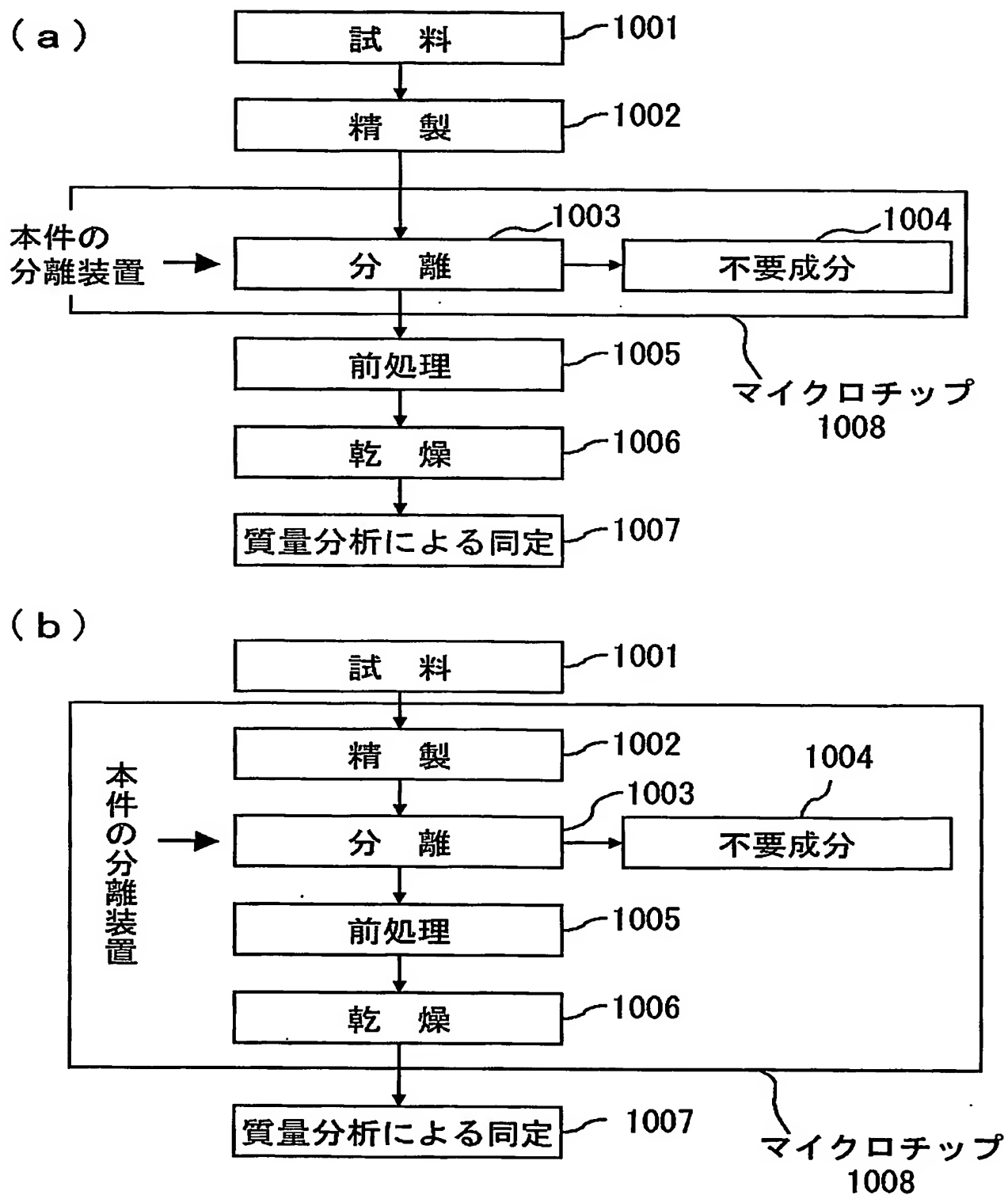


Fig.22



1 / 1

SEQUENCE LISTING

<110> NEC Corporation

<120> Apparatus for separation and Method of separation

<130> 34103740

<160> 1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 1

tcgattttca aaccgtttcc 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N1/10, 27/26, 27/62, 30/48, 33/48, 35/08, 37/00,
B01D57/00, 57/02, B81C1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N1/00-1/44, 27/26-27/49, 27/62-27/68, 30/00-30/96,
33/48-33/49, 35/08-35/10, 37/00, B01D57/00, 57/02,
B81C1/00-B82B3/00, H01J40/00-49/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP 2001-515216 A (CEPHEID), 18 September, 2001 (18.09.01), Par. Nos. [0054] to [0055], [0085] to [0090]; Figs. 1 to 22 & WO 99/009042 A1 & AU 8906698 A & CA 2301309 A & EP 1003759 A & US 2001-12612 A1 | 1-9 |
| Y | JP 10-506991 A (Abbott Laboratories), 07 July, 1998 (07.07.98), Full text; Figs. 1 to 6 & WO 96/010747 A1 & CA 2195875 A & EP 783694 A & US 5952173 A1 | 1-9 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
|---|--|

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 16 March, 2004 (16.03.04) | Date of mailing of the international search report 30 March, 2004 (30.03.04) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15260

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | JP 2002-524755 A (Advion Biosciences Inc.), 06 August, 2002 (06.08.02), Par. No. [0136]; Figs. 25 to 49 & WO 00/015321 A1 & CA 2343055 A & AU 5800499 A & EP 1113850 A & US 123153 A1 | 1-9 |
| Y | WO 2002/023180 A (Hitachi, Ltd.), 21 March, 2002 (21.03.02), Examples 1, 2; Figs. 1 to 7 (Family: none) | 1-9 |
| A | SANO, BABA, IGUCHI, IIDA, KAWAURA, SAKAMOTO, Dai 63 Kai Extended Abstracts; The Japan Society of Applied Physics, separate Vol.3, 24 September, 2002 (24.09.02), page 1146 (25a-R-8) | 1-9 |
| A | M.Baba, T.Sano, N.Iguchi, K.Iida, T.Sakamoto, H.Kawaura, Sixth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2002), 03 November, 2002 (03.11.02), Vol.2, pages 763 to 765 | 1-9 |
| A | Chia-Fu Chou et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 23 November, 1999 (23.11.99), Vol.96, No.24, pages 13762 to 13765 | 1-9 |
| A | JP 9-504362 A (British Technology Group USA Inc.), 28 April, 1997 (28.04.97), Page 24, line 13 to page 25, line 5; Fig. 7 & WO 94/029707 A1 & US 5427663 A & EP 711412 A & US 5837115 A1 & CA 2164720 A | 1-9 |
| A | US 6027623 A (Toyo Technologies, Inc.), 22 February, 2000 (22.02.00), Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none) | 1-9 |
| A | JP 2002-292600 A (Mitsui Chemicals, Inc.), 08 October, 2002 (08.10.02), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none) | 1-9 |
| A | JP 2002-502597 A (Aclara Biosciences, Inc.), 29 January, 2002 (29.01.02), Full text; Figs. 1 to 27 & WO 99/40174 A1 & AU 2488799 A & EP 1053298 A & US 5126022 A1 | 1-9 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N1/10, 27/26, 27/62, 30/48, 33/48, 35/08, 37/00, B01D57/00, 57/02, B81C1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N1/00-1/44, 27/26-27/49, 27/62-27/68, 30/00-30/96, 33/48-33/49, 35/08-35/10, 37/00, B01D57/00, 57/02, B81C1/00-B82B3/00, H01J40/00-49/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2004年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2004年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2004年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | JP2001-515216 A (シ-フィート [®]) 2001.09.18 【0054】 - 【0055】, 【0085】 - 【0090】 図1-図22 & WO 99/009042 A1 & AU 8906698 A & CA 2301309 A & EP 1003759 A & US 2001-12612 A1 | 1-9 |
| Y | JP10-506991 A (アボット・ラボラトリーズ [®]) 1998.07.07 全文 図1-図6 & WO 96/010747 A1 & CA 2195875 A & EP 783694 A & US 5952173 A1 | 1-9 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.03.2004

国際調査報告の発送日

30.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JPO)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高見 重雄

2J

9116

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | JP2002-524755 A (アドヴァイオン バイオサイエンス インコーポレーテッド) 2002. 08. 06 【0136】 図25-図49 & WO 00/015321 A1 & CA 2343055 A & AU 5800499 A & EP 1113850 A & US 123153 A1 | 1 - 9 |
| Y | WO 2002/023180 A (株式会社日立製作所) 2002. 03. 21 【実施例1】 【実施例2】 図1-7 (ファミリーなし) | 1 - 9 |
| A | 佐野、馬場、井口、飯田、川浦、阪本、第63回応用物理学会学術講演会講演予稿集 第3分冊 2002年9月24日 p.1146 (25a-R-8) | 1 - 9 |
| A | M. Baba, T. Sano, N. Iguchi, K. Iida, T. Sakamoto, H. Kawaura, Sixth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2002) November 3, 2002 Vol. 2 p. 763-765 | 1 - 9 |
| A | Chia-Fu Chou et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, November 23, 1999 Vol. 96 No. 24 p. 13762-13765 | 1 - 9 |
| A | JP 9-504362 A (ブリティッシュ・テクノロジー・グループ・ユースエイ・インコーポレーテッド) 1997. 04. 28 第24頁第13行-第25頁第5行 図7 & WO 94/029707 A1 & US 5427663 A & EP 711412 A & US 5837115 A1 & CA 2164720 A | 1 - 9 |
| A | US 6027623 A (Toyo Technologies, Inc.) 2000. 02. 22 全文 第1-4図 (ファミリーなし) | 1 - 9 |
| A | JP2002-292600 A (三井化学株式会社) 2002. 10. 08 全文 図1-図5 (ファミリーなし) | 1 - 9 |
| A | JP2002-502597 A (アクレイラ バイオサイエンス インコーポレーテッド) 2002. 01. 29 全文 図1-図27 & WO 99/40174 A1 & AU 2488799 A & EP 1053298 A & US 5126022 A1 | 1 - 9 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.